

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingeniero en
Biotecnología de los Recursos Naturales.**

TEMA:

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *CAUCAEA*
(ORCHIDACEAE) MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE Y ANÁLISIS
QUÍMICO DE LOS AROMAS FLORALES**

AUTORES:

JONATHAN LEONARDO ALBÁN REINOSO

CHRISTIAN LEONARDO TOAPANTA CANTUÑA

TUTOR:

MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, marzo de 2019

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Jonathan Leonardo Albán Reinoso, con documento de identificación N° 1722890959 y Christian Leonardo Toapanta Cantuña, con documento de identificación N° 1720896586, respectivamente manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *CAUCAEA* (*ORCHIDACEAE*) MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE Y ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS AROMAS FLORALES”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Jonathan L. Albán Reinoso

Cédula: 1722890959

Fecha: marzo de 2019



Nombre: Christian L. Toapanta Cantuña

Cédula: 1720896586

Fecha: marzo de 2019

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *CAUCAEA* (*ORCHIDACEAE*) MEDIANTE EL SISTEMA BARCODE Y ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS AROMAS FLORALES”, realizado por Jonathan Leonardo Albán Reinoso y Christian Leonardo Toapanta Cantuña, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2019



Marco Fernando Cerna Cevallos

CI: 0501872071

Dedicatoria

A Dios por haber guiado mi camino y haberme dado salud y vida para completar esta etapa.

A mi madre Gloria, mi mejor amiga, por haberme aconsejado en los momentos difíciles y por haberme brindado todo su amor y sabiduría, y que desde el cielo estará cuidando de mí y de mis hermanos y mirando orgullosa a su primer hijo graduado.

A mi padre Julio y mi abuelita Martha por haberme brindado su guía, apoyo y cariño de manera incondicional, y por haber velado siempre en que sea una persona de bien y que no me falte nada.

A mis hermanos menores Cristhian y Joel por alentarme y estar siempre conmigo en las buenas y en las malas

Jonathan.

A mi madre por brindarme sabiduría, fortaleza y su amor incondicional.

A mi esposa Salomé y mi hijo Dael quienes me dan luz y me impulsan a ser mejor persona.

Kari quien me ha sabido guiar en mi infancia y adolescencia.

Mis abuelos a quienes guardo un lugar en mi corazón.

Agradezco a la vida porque cada día es una oportunidad para seguir conquistando metas, nunca es demasiado tarde para cumplir tus sueños.

Christian.

Agradecimiento

A nuestro tutor Marco Cerna Ph.D. por habernos dado la confianza de desarrollar nuestro tema de tesis y formar parte del grupo de investigación NUNKUI WAKAN, el cual nos apoyó con toda su experiencia en biología molecular para la correcta ejecución del proyecto.

Agradecemos a Alexander Hirtz y Luis Baquero por sus asesorías constantes y por todo el conocimiento que supieron brindarnos para llevar a cabo la culminación de nuestra investigación. A Sara Gutiérrez, Mario Portilla, Pepe Portilla, Iván Acaro y Francisco Tobar por ayudarnos con las muestras vegetales para el presente trabajo.

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana quien financio nuestro proyecto a través de los fondos para investigación 2018 y a las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular del CIVABI, así como a sus ayudantes por habernos colaborado a cada paso durante el desarrollo de nuestro trabajo de titulación.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco Conceptual	4
1.1 Familia <i>Orchidaceae</i>	4
1.2 Taxonomía.....	5
1.3 Importancia.....	6
1.4 Género <i>Caucaea</i>	7
1.4.1 Descripción morfológica.....	9
1.5 DNA Barcode	10
1.6 Marcadores Moleculares	12
1.7 Marcadores Moleculares en Orquídeas	12
1.7.1 <i>matK</i>	13
1.8 Análisis Químico de los Aromas Florales	14
1.8.1 Extracción Sólido-Líquido.....	15
1.8.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	15
1.8.3 Cromatografía de gases.....	16
Capítulo 2.....	17
Materiales y métodos	17
2.1 Recolección de muestras	17
2.2 Análisis molecular	18

2.2.1 Extracción de ADN.....	18
2.2.2 Amplificación	19
2.2.3 Estimación del ADN.....	19
2.2.4 Secuenciación	20
2.2.5 Análisis Bioinformático.....	20
2.2.6 Análisis Filogenético	21
2.2.7 Georreferenciación.....	21
2.3 Análisis químico de los aromas florales.....	21
2.3.1 Preparación de muestras	21
2.3.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	22
2.3.3 Filtración de muestras y preparación de viales.....	22
2.3.4 Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	22
Capítulo 3.....	24
Resultados y discusión	24
3.1 Recolección de muestras	24
3.2 Análisis molecular	26
3.2.1 Extracción de ADN.....	26
3.2.2 Amplificación	27
3.2.3 Estimación del ADN.....	27
3.2.4. Secuenciación	28
3.2.5. Análisis Bioinformático.....	28

3.2.6. Análisis filogenético	28
3.2.7 Georreferenciación.....	31
3.3 Análisis químico de los aromas florales	37
4. Conclusiones	46
5. Recomendaciones.....	47
6. Bibliografía	48
7. Anexos	59

Índice de tablas

Tabla 1. Preparación de la mezcla PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix	19
Tabla 2. Programa de temperatura para la columna.....	23
Tabla 3. Listado de especies del género <i>Caucaea</i> (<i>Orchidaceae</i>) utilizadas para análisis filogenético.....	24
Tabla 4. Tabla de Georreferencias de muestras de <i>Caucaea</i>	32
Tabla 5. Composición química de los compuestos volátiles de 8 especies del género <i>Caucaea</i>	40

Índice de figuras

Figura 1. Distribución total de las Orquídeas	5
Figura 2. Clasificación del género <i>Caucaea</i> según Dodson	9
Figura 3. Descripción morfológica de <i>Caucaea dodsoniana</i> Szlach y Kolan.	10
Figura 4. Genes que son candidatos a ser códigos de barras en plantas.	11
Figura 5. Estructura general del gen cloroplastídico <i>matK</i>	13
Figura 6. Gel electroforético del producto PCR del segmento <i>matK</i>	27
Figura 7. Electroferograma de secuencia de ADN amplificado.	28
Figura 8. Árbol filogenético de especies del género <i>Caucaea</i> usando el marcador molecular <i>matK</i>	29
Figura 9. Distribución de especies del género <i>Caucaea</i> en el Ecuador	33
Figura 10. Árbol filogenético de todos los individuos recolectados del género <i>Caucaea</i> para la región <i>matK</i>	36

Índice de Anexos

Anexo 1. Fotografías de especies del género <i>Caucaea</i> (<i>Orchidaceae</i>) utilizadas para estudio filogenético	59
Anexo 2. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN	68
Anexo 3. Distribución geográfica de especies del género <i>Caucaea</i> utilizadas en esta investigación	71
Anexo 4. Tiempos de retención y porcentaje de cada compuesto de las especies analizadas	73

Resumen

La familia *Orchidaceae* es considerada una de las familias más grandes del mundo además de su importancia económica, ornamental y ecológica. *Caucaea* es un género de orquídeas epífitas que se distribuye en Ecuador, Colombia y Venezuela por encima de los 2500 m.s.n.m, se reconocen 23 especies descritas de las cuales solo 9 han sido aceptadas, por lo tanto actualmente no existe una correcta clasificación y descripción de este género.

Se recolectaron 98 muestras de diferentes orquidearios y colecciones privadas para la identificación molecular mediante el sistema *BARCODE*, se extrajo ADN del tejido vegetal, seguido de la amplificación de un segmento del gen *matK* por el método de PCR convencional para la posterior secuenciación por el método Sanger automatizado y finalmente establecer la filogenia utilizando el software Mega 7. En el árbol filogenético se agruparon las especies en 9 clados evidenciando el nivel de divergencia del gen *matK* y la posibilidad de definir nuevas especies presentes en el Ecuador para lo cual se sugiere investigar nuevas regiones de ADN cloroplástico y nuclear.

Se elaboró un mapa de distribución de las especies estableciendo la correlación de los datos con la información filogenética, se determinó que los puntos de diversificación del género *Caucaea* se ubican en la zona sur del Ecuador y presenta 3 corredores biológicos. Además, se realizó el análisis químico de los aromas florales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de las especies que se encontraban en floración detectando un total de 95 compuestos químicos.

Palabras clave: *ADN Barcoding*, *Caucaea*, *GC-MS*, *matK*, *Orchidaceae*

Abstract

The *Orchidaceae* family is considered one of the largest families in the world in addition to its economic, ornamental and ecological importance. *Caucaea* is a genus of epiphytic orchids that is distributed in Ecuador, Colombia and Venezuela above 2500 m.s.n.m, 23 species are recognized, of which only 9 have been accepted, so there is currently no correct classification and description of this genus.

We collected 98 samples from different orchids and private collections for molecular identification using the BARCODE system, extracted DNA from the plant tissue, followed by the amplification of a segment of the *matK* gene by the conventional PCR method for subsequent sequencing using the Sanger method. automated and finally establish the phylogeny using Mega 7 software. In the phylogenetic tree, the species were grouped in 9 clades, showing the level of divergence of the *matK* gene and the possibility of defining new species present in Ecuador, for which it is suggested to investigate new regions of chloroplastic and nuclear DNA.

A map of distribution of the species was elaborated establishing the correlation of the data with the phylogenetic information, it was determined that the points of diversification of the *Caucaea* genus are located in the south zone of Ecuador and it presents 3 biological corridors. In addition, the chemical analysis of the floral aromas was carried out by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) of the species that were in flowering, detecting a total of 95 chemical compounds.

Keywords: *Caucaea*, DNA Barcoding, GC-MS, *matK*, *Orchidaceae*

Introducción

Orchidaceae es una de las familias vegetales más abundantes en el mundo, debido a que acoge aproximadamente a la séptima parte de todas las especies vegetales con flores presentes en la tierra (Bustos, 2006). Rivero y Chirino (2015) mencionan que en la actualidad existen cerca de 1000 géneros con 25 a 30000 especies aproximadamente, las cuales pueden ser terrestres o epífitas, además también existe una gran cantidad de especies híbridas.

Por esta razón, la familia *Orchidaceae* ha sido admirada, apreciada y ampliamente estudiada desde hace muchos siglos atrás, y un claro ejemplo que lo evidencia es el manuscrito “Indagaciones sobre Plantas”, que fue escrito por Theophrastus en el año 300 a.C., y describe a las orquídeas presentes en el Mediterráneo (Hirtz, 2004).

El interés por el estudio de esta familia se expandió por todo el mundo, y en América la primera referencia se encuentra en “El Badiano”, cuyo manuscrito hace referencia a las plantas medicinales e incluye al fruto de ciertas orquídeas como alternativas de medicina para combatir enfermedades (Bustos, 2006).

Para el Ecuador, Dodson y Escobar (2005) mencionan que la primera recolección documentada de orquídeas ecuatorianas la realizó Thaddus Haenke en 1790, hasta la fecha se han catalogado más de 4000 especies presentes en nuestro país, siendo un valor altamente representativo ya que, si consideramos la superficie del país, más del 20% de las plantas vasculares serían orquídeas.

Por tal motivo, la autenticación exacta de las especies de orquídeas es fundamental para alcanzar la conservación de la biodiversidad y la utilización de éstas como recursos vegetales. Uno de los métodos para identificar las especies de la familia *Orchidaceae* consiste en la identificación taxonómica, para lo cual es necesario conocer las características vegetativas y florales de los especímenes (Castellanos &

Torres, 2018). Sin embargo, la ausencia de dicha información podría impedir la identificación y diferenciación entre especies, por esta razón las técnicas moleculares se han convertido en herramientas indispensables para lograr la autenticación exacta, de hecho los marcadores de “Códigos de barras de ADN” han permitido identificar las especies con gran exactitud independientemente del ciclo de vida de la planta. Muller *et al.* (2006) y Parvenn, Singh, Malik, Raghuvanshi, y Babbar (2017) señalan en sus respectivas investigaciones que el marcador cloroplástico *matK* proporciona identificación máxima para las especies analizadas, debido a su elevada tasa mutacional, por esto ha sido considerado uno de los marcadores más empleados para estudios sistemáticos y evolutivos.

Además, uno de los propósitos de la identificación molecular de especies es verificar la denominación taxonómica que el colector o botánico inicial haya registrado sobre una planta, principalmente en el caso de existir controversias. Tal es el caso de *Caucaea* que es un género perteneciente a la familia *Orchidaceae*, es importante mencionar que el estudio de Kraenzlin sugirió la incorporación de *Oncidium* y *Cucullatum* en un solo género el cual ha sido denominado *Caucaea*. Sin embargo, ha sido motivo de discusión por más de 175 años y aún no se ha logrado obtener un compendio satisfactorio de todas sus especies (Stacy, 1975). Mazo *et al.* (2014) menciona en su artículo “Consideraciones sobre la historia de la prioridad taxonómica de *Oncidium*” que las prioridades taxonómicas de estos géneros aún están por aclararse.

En el Ecuador existen estudios sobre diversidad genética de orquídeas, pero a nivel general, un ejemplo de esto es el trabajo de Carrión (2009) en el cual se realiza un análisis filogenético de 22 especies de orquídeas mediante el uso de *matK*, *trnL-F* y una región *ITS* (ADN nuclear), concluyendo que el método Barcoding y

específicamente el uso de *matK* ayuda a diferenciar con mayor exactitud las especies por presentar mayor variabilidad en esta región.

Las plantas han desarrollado mecanismos basados principalmente en señales olfativas y visuales que los hacen únicos para sus polinizadores específicos, estos mecanismos han evolucionado junto con las variaciones intraespecíficas e interespecíficas en los aromas florales para determinadas especies (Grajales, Meléndez, & Cruz, 2011) .

Para Anaya (2003) la fragancia o esencia de las flores determinan en la mayoría de casos la atracción que éstas ejercen sobre los insectos polinizadores, además señala que el olor de la flor se encuentra acoplado al tiempo en el cual el polen está maduro, y dentro de la familia *Orchidaceae*, cada especie posee una combinación única de terpenos y fenoles volátiles que es detectada por un tipo de abeja polinizadora.

Acorde a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo de titulación tiene como objetivo general identificar molecularmente especies de orquídeas del género *Caucaea* mediante el sistema Barcode, para lo cual se recolectaron muestras de tejido vegetal para su posterior extracción de ADN, amplificación de la región cloroplástica *matK* mediante la técnica de PCR convencional y secuenciación por el método Sanger automatizado para la identificación a nivel de especies las muestras analizadas, cuyos resultados son representados en un árbol filogenético analizado en el programa Mega 7 y la distribución de las especies utilizando el software DIVA-GIS.

Además, tiene como objetivo específico analizar la composición química de los aromas que emanan las flores mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El estudio de los aromas florales en diversas plantas ha permitido entender la relación existente entre éstos y sus polinizadores, así como las fuerzas evolutivas que conllevan a estas complejas interacciones.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1 Familia *Orchidaceae*

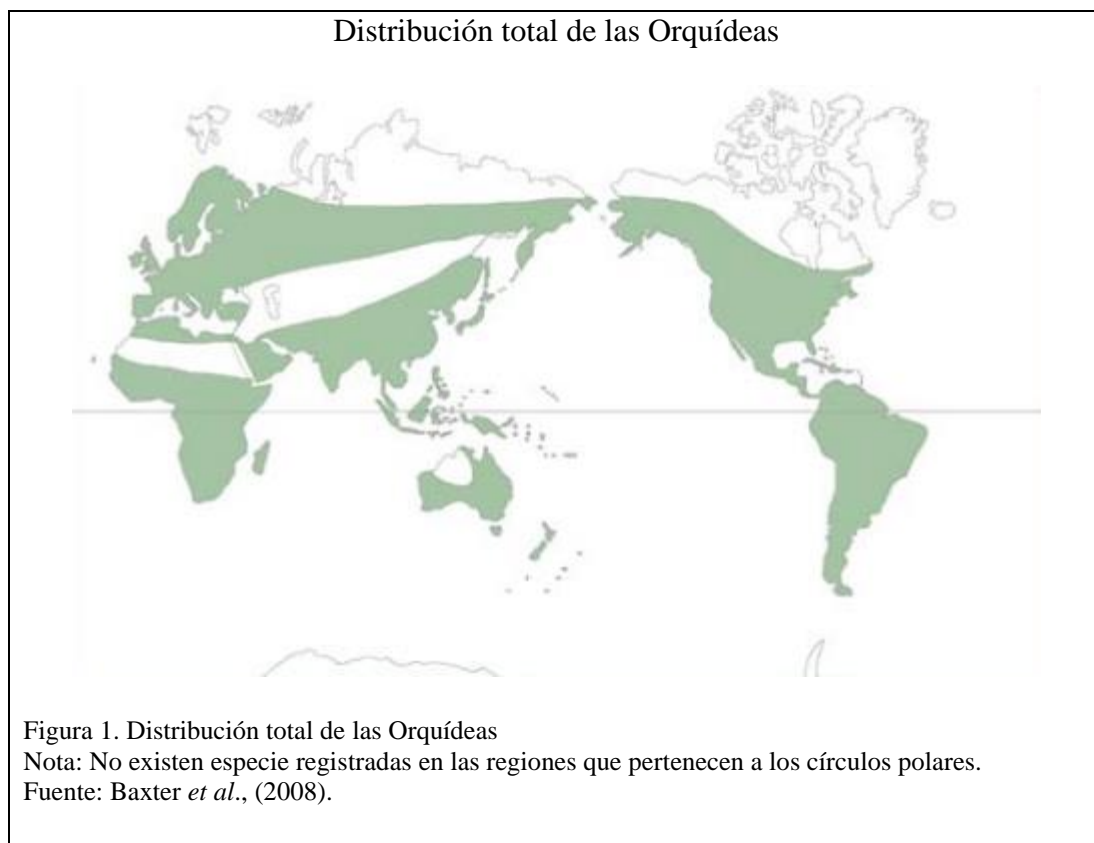
Orchidaceae es considerada una de las familias más grandes del mundo, debido a que en la actualidad se distribuyen en unos 1000 géneros con 25 a 30000 especies aproximadamente (Rivero & Chirino, 2015).

De manera histórica la familia *Orchidaceae* tuvo su expansión en un período que va del Cretácico al Mioceno superior, lo que ocasionó una dispersión temprana de la familia y la distribución tropical y subtropical de géneros. Además, mediante análisis recientes utilizando técnicas moleculares de ADN, se sugiere que la familia *Orchidaceae* se desarrolló en el gran continente de Gondwana antes de que se separara para formar los continentes del sur de Australia, África y América del Sur, la Isla de Madagascar, y el subcontinente de la India (Xinqi *et al.*, 2009).

El nombre de la familia *Orchidaceae* proviene de la palabra griega *orkhis*, que significa testículos y fue usada por Teofrasto de Ereso (ca. 371 a. C. - ca. 286 a. C.) en su obra “*De causis plantarum*” para nombrar a una planta de esta familia. En el siglo XIX, cazadores y coleccionistas de orquídeas en busca de ejemplares cada vez más atractivos se embarcaron en la búsqueda de nuevas especies en las selvas de África, Indonesia, Java, Nueva Guinea, Borneo y América del Sur (Baxter, Hastings, Law, & Glass, 2008), conformando de esta manera colecciones privadas en donde las mejores especies eran aquellas con la flor más grande y menos comunes (Castellanos & Torres, 2018).

Las variaciones vegetativas, morfología floral, los hábitats que ocupan y su crecimiento epifítico le confieren a *Orchidaceae* una alta importancia taxonómica, ornamental y ecológica. Por estas razones, tal como se evidencia en la Figura 1,

Orchidaceae se ha distribuido ampliamente en el planeta ubicándose en los trópicos y subtropicos de Asia, África, Oceanía, América del norte, América central y América del Sur, así como en zonas templadas de Asia y Europa (Cetzal, Noguera, & Basu, 2014).



En Ecuador se encuentran 4250 especies y 219 géneros de orquídeas, de las cuales el 40% de estas son endémicas; debido a esto a Ecuador se lo considera uno de los 17 países mega diversos del mundo y desde noviembre de 2013, Ecuador fue declarado como “País de las Orquídeas” por contener más taxones registrados que Colombia y Perú (Ministerio del Ambiente, 2014).

1.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de la familia *Orchidaceae* propuesta por Cronquist, (1981) la agrupa en el orden *Orchidales*, clase *Liliopsida*, división *Magnoliophyta*. Actualmente existe una clasificación basada en datos moleculares, propuesta por la

Angiosperm Phylogeny Group IV (2016) que ubica a la familia *Orchidaceae* en el orden *Aspargales* del clado *Monocots* del grupo *Mesangiospermae*. Por otro lado Cetzal *et al.* (2014), subdivide a esta familia en 5 grupos: *Orchidoideae*, *Epidendroideae*, *Cypridiodeae*, *Vanilloideae*, y *Apostasiodeae*.

1.3 Importancia

Las orquídeas destacan principalmente por su belleza y sus funciones ecológicas dentro de los ecosistemas, ayudando en el incremento de masa vegetal en el dosel (parte alta de los bosques) debido a que son plantas epífitas que en conjunto con otras especies de plantas forman grandes cantidades de biomasa, de igual manera los estomas de las hojas capturan y fijan CO₂ mediante la fotosíntesis, función que favorece la conservación de la atmósfera debido a que el CO₂ es uno de los gases responsables del cambio climático; otra función importante de las orquídeas es que están asociadas a un gran número de hongos formadores de micorrizas orquideoides, las cuales cumplen funciones importantes respecto al ciclo de nutrientes dentro de los ecosistemas (Castellanos & Torres, 2018).

Estudiar la interacción de los polinizadores y las orquídeas es fundamental para la conservación de la familia *Orchidaceae* debido a que presentan diversos mecanismos de polinización que van desde el uso de colores brillantes que indican la presencia de néctar, simular mediante su labelo a una hembra de una especie específica de abeja o avispa lo cual permite que el macho visite la flor, adquiera los sacos polínicos de la orquídea y los transmita a otras flores (Wolfgang, 2019).

En la actualidad la familia *Orchidaceae* se encuentra dentro del grupo de plantas más vulnerables del mundo, debido a la sobre explotación del medio silvestre, tráfico ilegal y cambio climático (Rocha & Duque, 2017), por lo que realizar estudios relacionados

a la conservación y mantenimiento de estas especies resulta crucial para las futuras generaciones para el sostenimiento de los ecosistemas.

1.4 Género *Caucaea*.

Caucaea es un género de orquídeas epífitas que se distribuye a lo largo de América del Sur en los países de Colombia, Ecuador y Venezuela; sus especies se encuentran creciendo en bosques montanos fríos y húmedos o bosques nubosos andinos montañosos, con mayor frecuencia por encima de los 2500 m.s.n.m (Szlachetko & Kolanowska, 2015).

El género de orquídeas *Oncidium* y sus familiares han sido motivo de discusión por más de 175 años, de manera que no se ha logrado obtener un compendio satisfactorio de todas sus especies disponibles hasta la actualidad; Lindley fue el primer investigador en dar una revisión del género en el año de 1841 en su obra “Sertum Orchidaceum” detallando la existencia de 101 especies, y una versión más amplia de la misma en “Folia *Orchidaceae*” con 198 especies (Stacy, 1975).

Szlachetko y Kolanowska (2015) citan a Kraenzlin quien en el año 1922 propuso la primera clasificación integral del género reconociendo 18 secciones incluyendo la sección *Cucullatum*, de las cuales algunas fueron elevadas a rango genérico. Para Stacy (1975) la identidad de las plantas con flores coloridas y atractivas de la sección *Cucullatum* del género *Oncidium* se ha visto rodeada de confusión desde los primeros días de su introducción a la horticultura durante el siglo XIX, es por esto que en el año de 1975 realiza una publicación de la revisión del género *Oncidium* sugiriendo el carácter distintivo de la sección *Cucullatum* al igual que el estudio de Kraenzlin.

Los estudios moleculares que se realizaron posteriormente revelaron la estrecha relación de los representantes de la sección *Cucullatum* con el género *Caucaea*, el cual durante mucho tiempo se reconoció como un taxón monoespecífico que contenía solo

una especie que es *C. radiata*, a partir de dichos estudios los investigadores propusieron la agrupación de los dos géneros con el nombre *Caucaea*, pero este concepto fue rechazado por Dodson y Luer en el año 2005, debido a esto se realizaron estudios de morfología del ginostemo, confirmando así la similitud que existe en las estructuras reproductivas entre *C. radiata* y los representantes de la sección *Cucullatum* del género *Oncidium*, además Neubig para el año 2012 mediante análisis genético confirmó la distancia filogenética que existe de *Caucaea* con respecto a *Oncidium* pero no de la sección *Cucullatum* (Szlachetko & Kolanowska, 2015).

Según The Plant List (2018) este género comprende 23 especies descritas, de las cuales solo 9 han sido aceptadas, y según la base de datos Trópicos (2018) el género comprende 29 especies; es por esto que aún en la actualidad no existe una clasificación y descripción correcta de cada una de las especies que conforman el género, pero para algunos autores como Dodson (2003) *Caucaea* se separa en 6 “Unidades” incluyendo a *Caucaea radiata*, ver Figura 2.

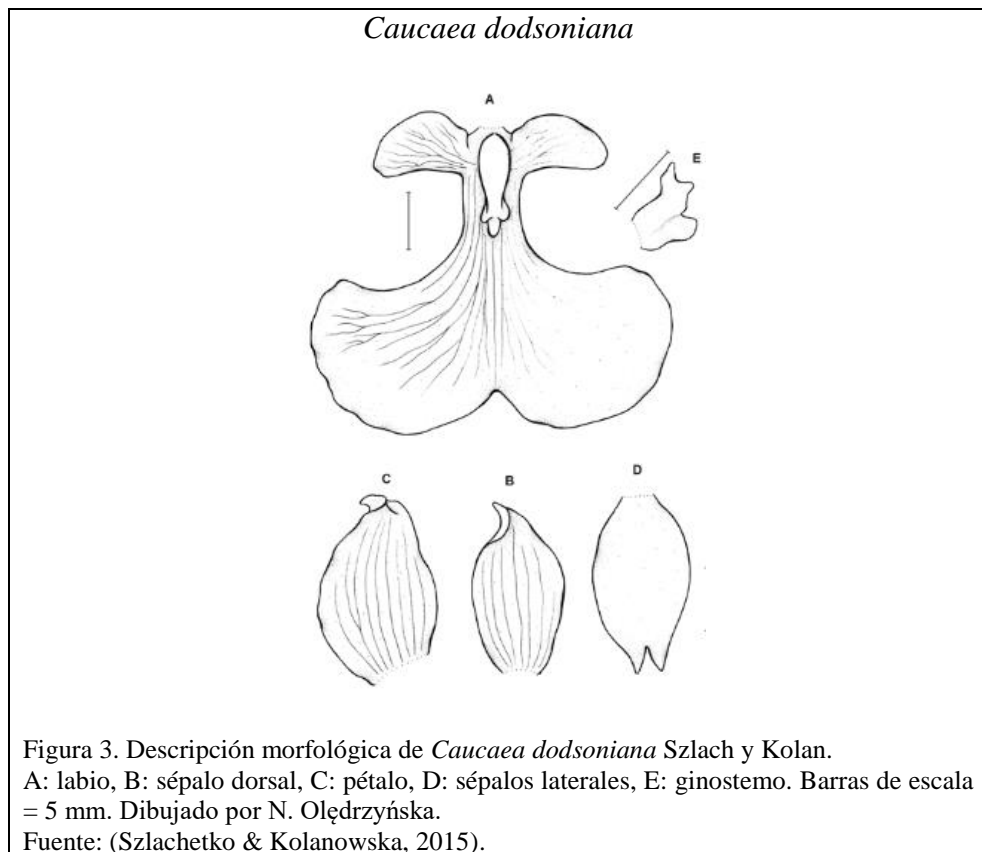
Para Dodson (2003) el acceso a las poblaciones naturales de este género resulta prácticamente imposible, debido a que en la actualidad las locaciones propias del género se encuentran amenazadas por la constante guerra provocada por guerrillas y narcotraficantes, además muchas poblaciones que se encontraban en herbarios y representadas en pinturas ya no existen en la naturaleza por la deforestación de sus hábitats.

Grupo <i>Caucaea</i>	
<p><i>Oncidium andigenum</i> Lindl & Rchb.f. (<i>Caucaea</i>)</p>	<p><i>Caucaea nubigenum</i> Lindl. (<i>Caucaea</i>)</p>
<p><i>Caucaea radiata</i> (Lindl.) Mansf.</p>	<p><i>Oncidium sanguinolentum</i> (Lindl.) Schltr. (<i>Caucaea</i>)</p>
<p><i>Oncidium olivaceum</i> Kunth (<i>Caucaea</i>)</p>	<p><i>Oncidium phalaenopsis</i> Lindl & Rchb.f. (<i>Caucaea</i>)</p>
<p>Figura 2. Clasificación del género <i>Caucaea</i> según Dodson Fuente: (Calaway Dodson, 2003).</p>	

1.4.1 Descripción morfológica

Las especies del género *Caucaea* están caracterizadas por presentar pseudobulbos que van de ovoides a cilíndricos, rodeados en la parte superior con 1 a 3 brácteas foliares y 2 hojas conduplicadas, posee flores resupinadas que se organizan en inflorescencias generalmente en zig-zag que van de 1 a muchas flores, poseen brácteas florales que son más cortas que los pedicelos y los ovarios, los sépalos laterales están parcialmente fusionados dejando el sépalo dorsal y los pétalos libres, el labio es panduriforme y

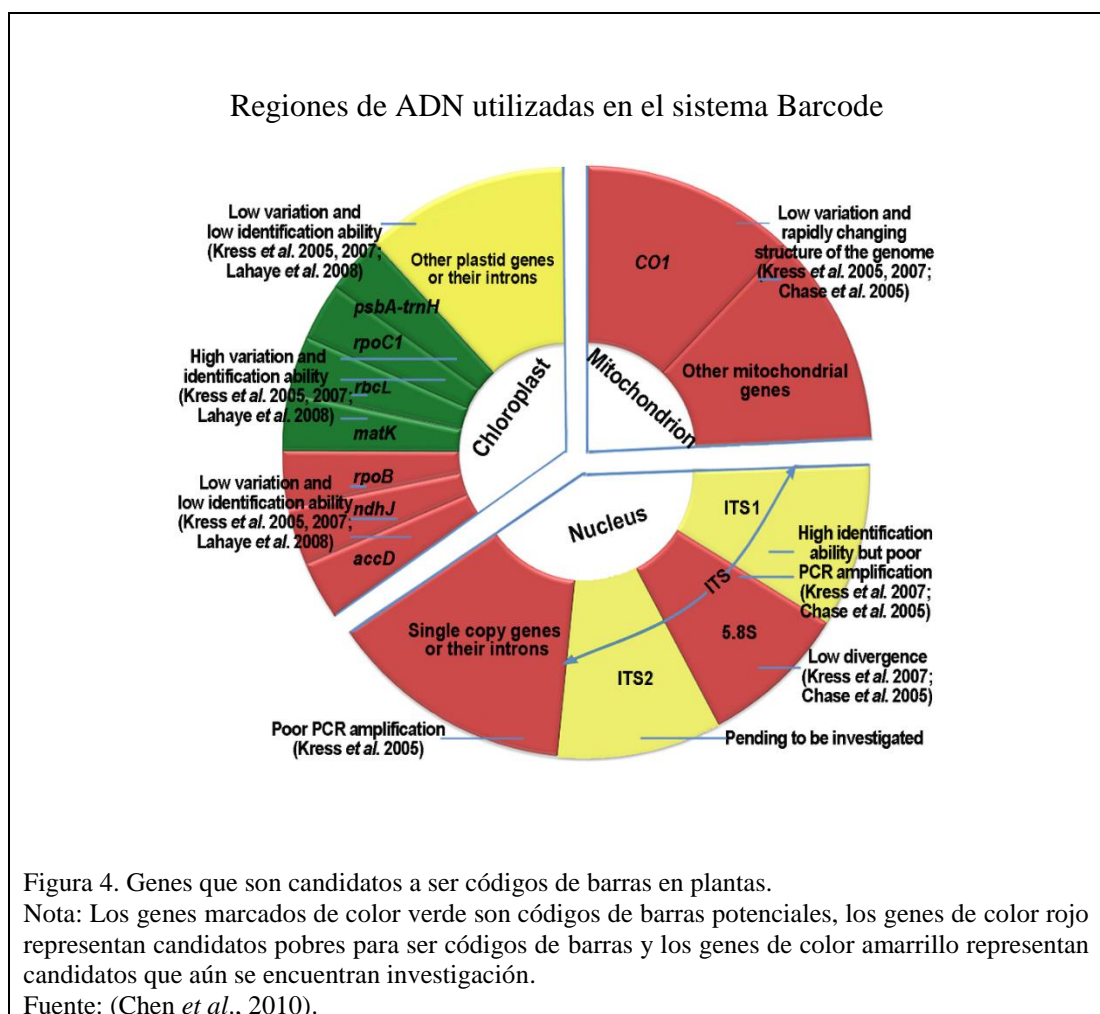
puede presentar 3 lóbulos profundos con un callo basal que puede tener de 2 a 3 crestas, la antera subapical es operculada, elipsoide y oscura, presenta 2 cámaras y el clinandrio forma un collar estrecho que rodea la base de la antera, el estigma se lo aprecia grande y se encuentra de manera inversa, elíptico y cóncavo, el ginostemio es ligeramente arqueado, es de 2 a 3 veces más largo que la antera, presenta alas y se encuentra pronunciada en la base, el rostelo es subrecto, ligulado, su remanente es bilobulado, ligeramente cóncavo entre los lóbulos agudos y canaliculado en la superficie dorsal (Szlachetko & Kolanowska, 2015), ver Figura 3.



1.5 DNA Barcode

La metodología de “DNA Barcode” o “DNA Barcoding” es una opción de análisis de ADN la cual permite proporcionar un enfoque de identificación práctico y estandarizado a nivel de especie; esta metodología se puede utilizar para evaluar la

biodiversidad, la filogenética y estudios ecológicos (Vu, Le, Nguyen, Tran, & Tran, 2017). DNA Barcoding o Código de barras del ADN en español, es un método genético que utiliza regiones específicas del ADN para identificar especies, esto se realiza con el fin de obtener códigos de barras de todos los organismos vivos y hacer de esta información pública para conservar y mantener la biodiversidad faunística y florística del mundo; para las plantas terrestres los principales marcadores utilizados para código de barras de ADN son dos secciones de regiones codificantes dentro del cloroplasto pertenecientes a los genes *rbcL* y *matK* (Vere, Rich, Trinder, & Long, 2015) y el marcador de código de barras que se utiliza en el núcleo es parte del gen ITS (Vu *et al.*, 2017), ver Figura 4.



1.6 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son un segmento de ADN con una ubicación física (locus) en un cromosoma cuya herencia puede ser rastreable (Pérez, 1997); y según Azofeifa (2006) estos han sido definidos como cualquier diferencia fenotípica que se controla genéticamente.

Los tipos de marcadores moleculares se agrupan y se dividen en dos categorías: 1) marcadores moleculares basados en PCR, como: RAPD, ALP, SSRs, AFLP, SCARs, STS, SPLAT, VNTRs, DAF, SNPs, STRs y SSCP; y 2) marcadores moleculares basados en hibridación, como: RFLP (Kordrostami & Rahimi, 2015).

Las células vegetales contienen tres tipos de genomas: el genoma nuclear, el genoma cloroplástico y el genoma mitocondrial (Parvenn *et al.*, 2017). En el ADN nuclear se encuentra la mayor parte de la información genética de la célula, esta se encuentra empaquetada en cromosomas asociados a histonas (Alcántara, 2007), es el ADN que posee el genoma más grande de los tres debido a que está formado por millones de kilobases; el genoma mitocondrial posee de 200 a 2500 kb y el genoma cloroplástico posee de 120 a 217 kb, haciendo de este último el ADN más pequeño (Cuéllar, 2011).

1.7 Marcadores Moleculares en Orquídeas

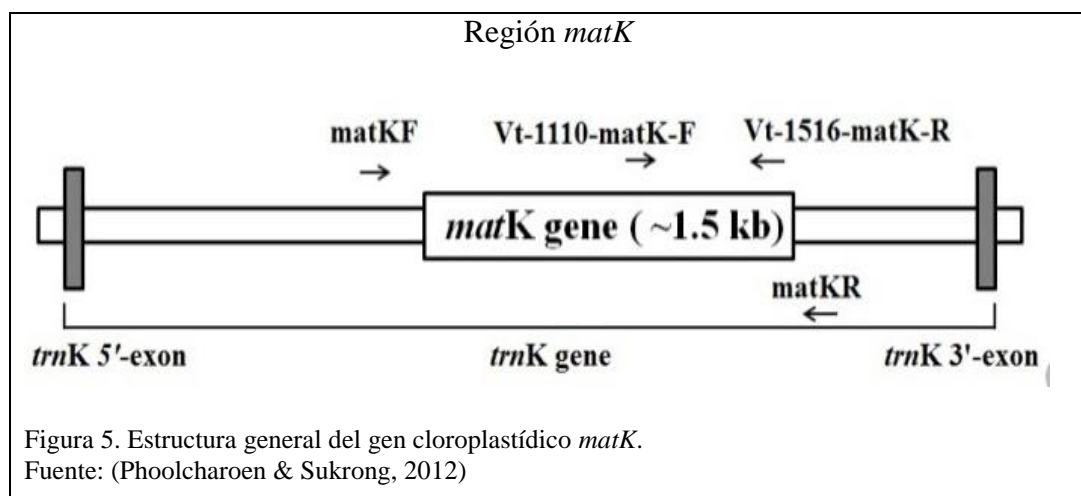
La autenticación exacta de las especies de orquídeas es fundamental para la conservación de la biodiversidad y la utilización de estas como recursos vegetales, muchos investigadores han desarrollado pruebas genéticas que pueden determinar de manera fácil y barata una especie basándose en herramientas de “Códigos de barras de ADN” utilizando marcadores moleculares, como: *ITS*, *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL*, *ycfL*, *atpF-atpH*, *rps16-trnQ*, *trnL-F* y *psbK-psbI* (Vu *et al.*, 2017).

Estudios realizados en orquídeas como el de Parvenn *et al.* (2017), señalan que el marcador cloroplástico *matK* proporciona la identificación máxima de especies

analizadas; esta conclusión se llevó a cabo tras la evaluación de cinco diferentes loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK* e *ITS*) usados para realizar DNA Barcoding en orquídeas de la India, en donde se encontró que *matK* solo, o en combinación con *trnH-psbA* pudo identificar correctamente más del 90% de las especies de orquídeas analizadas, proponiendo así a *matK* como un código de barras de ADN adecuado para todas las plantas terrestres; además estudios como el de Iza (2018) afirman que *matK* presenta un alto potencial de discriminación sobre otros marcadores moleculares como *rpoC1* y *rpoB* según la visualización de la filogenia.

1.7.1 *matK*

El gen *matK* codifica la enzima maturasa K, posee una rápida evolución y es utilizado como marcador molecular en estudios filogenéticos (Vu *et al.*, 2017). Se encuentra entre los dos exones de *trnK* 5' y *trnK* 3' de la región de copia única del genoma cloroplástico (Kar, Goyal, & Sen, 2015). El ORF (Open Reading Frame) de la matriz es de aproximadamente 1500 pb, ver Fig. 3; lo que corresponde a la formación de 500 aminoácidos, la variación de nucleótidos es tres veces mayor y la tasa de sustitución de aminoácidos es seis veces mayor que en *rbcL*, esto se traduce en un número mayor de informes de parsimonia y una fuerte señal filogenética (Barthet & Hilu, 2007).



El consorcio para el grupo de trabajo de plantas de código de barras de la vida (CBOL) recomendó la combinación de los locus *rbcL* y *matK* como los códigos de barras estándar para trabajos filogenéticos, basado en evaluaciones de recuperabilidad, niveles de discriminación entre especies y calidad de las secuencias (Kar *et al.*, 2015).

1.8 Análisis Químico de los Aromas Florales

Las plantas han desarrollado mecanismos basados principalmente en señales olfativas y visuales que los hacen únicos para sus polinizadores específicos, estos mecanismos han evolucionado junto con las variaciones intraespecíficas e interespecíficas en los aromas florales para determinadas especies (Grajales *et al.*, 2011).

Según Dodson, Dressler, Hills, Adams y Williams (1969), la atracción de los polinizadores por especies específicas es una característica distintiva de las orquídeas más evolucionadas, debido a que los agentes polinizadores aíslan y evitan hibridación entre poblaciones compatibles, esto explica a su vez que la gran parte de la variación floral de las orquídeas sea el resultado de los reordenamientos morfológicos utilizados para acomodarse a las necesidades de diversos organismos polinizadores.

En la actualidad se tiene varias teorías que explican las interacciones que se dan en la polinización, estas son: 1) la genética ecológica de los rasgos florales asociados con los cambios de los polinizadores, 2) el impacto de los animales herbívoros en la extinción floral, 3) el grado en que las interacciones de los polinizadores son especializadas frente a las generalizadas y 4) la estructura de las redes alimentarias de plantas polinizadoras (Raguso, 2015).

Grajales *et al.* (2011) afirma que dependiendo de la ontogenia del individuo, los compuestos volátiles de los aromas florales pueden variar y afectarse con la hora del día, temperatura y humedad relativa, provocando así que los insectos polinizadores tengan presente el momento de la producción de compuestos volátiles por parte de las

plantas tanto para la atracción como para la defensa; para el estudio de los aromas florales se emplean metodologías como la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas la cual separa, identifica y cuantifica la composición química de los componentes volátiles de las flores.

1.8.1 Extracción Sólido-Líquido

En general se denomina extracción sólido-líquido al contacto de un sólido triturado con un líquido (disolvente), en el cual algunas sustancias que incorpora el sólido en su composición se solubilizan obteniendo como resultado un sólido agotado y un extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas (Ortuño, 2006).

Este proceso se utiliza en laboratorio porque a escala industrial los costos son elevados por el valor de los disolventes, los extractos obtenidos con disolventes derivados de petróleo (hexano, diclorometano, éter dietílico, etc.) suelen ser oscuros por el arrastre de pigmentos, su solubilidad en alcohol es menor y se recuperan muchos compuestos aromáticos (Peredo, Palou, & López, 2009)

1.8.2 Extracción asistida por ultrasonido

El ultrasonido es considerado como fuente potencial para el incremento de reactividad química, se utiliza en procesos químicos e industriales, es aplicado como alternativa o complemento a los procesos de extracción de compuestos volátiles de plantas incrementando la eficiencia y reducción del tiempo del proceso. La proporción en la composición y rendimiento depende del disolvente y la temperatura a la cual se lleve a cabo, cuando la extracción se realiza a 25°C disminuye el riesgo de degradación térmica de constituyentes termolábiles, se reduce el consumo del disolvente por tanto la contaminación ambiental es menor al igual que los costos de operación (Acosta, Salomón, Sevilla, & Nuevas, 2016)

1.8.3 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es el proceso mediante el cual se separa el solvente y los analitos de una muestra en una forma gaseosa, los cuales posteriormente son separados en picos individuales señalando a su vez compuestos individuales (Whitman, 2017).

La separación de la mezcla dentro del cromatógrafo se logra mediante la distribución repetida de cada componente entre dos fases, en la cromatografía de gases la fase móvil es siempre un gas, pudiendo ser este N₂, H₂ o He, y la fase estacionaria es un líquido viscoso recubierto en su pared interna con una columna capilar. El transporte de los analitos se lo realiza únicamente en la fase gaseosa y la separación se realiza en la fase estacionaria, en el cual la calidad de la separación dependerá del tiempo que permanezcan los componentes en la fase estacionaria y de la frecuencia de interacción que tengan con esta, la cual está determinada por los grupos funcionales (Macherey-Nagel, 2014).

1.8.3.1 Cromatografía de gases- Espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica mediante la cual se logra conseguir la separación de mezclas muy complejas mientras que la espectrometría de masas es una técnica que permite identificar de manera muy precisa cualquier sustancia pura, pero no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla; de esta manera mediante la asociación sinérgica de las dos técnicas da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002)

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Recolección de muestras

Las muestras de material vegetal recolectado para el presente estudio consistió en flores y tejido foliar de especies del género *Caucaea* previamente identificadas morfológicamente las cuales fueron proporcionadas por: “Jardín Botánico de Quito”, “Colección de Alex Hirtz”, Jardín Botánico “Orquídeas de Sarina”, En Cuenca “Ecuagenera Orquídeas del Ecuador”, “Mundiflora” y “Ecuafior”; obteniendo finalmente un total de 98 muestras a las cuales se les asignó un código y registro en el libro de campo de Marco Cerna, ver Tabla 3.

Las muestras vegetales recolectadas para el presente estudio consistieron en tejido foliar joven de plantas visiblemente sin daños mecánicos y libre de enfermedades como expresa Alonso *et al.* (2016). Cada muestra de tejido vegetal se obtuvo cortándola con una hoja de afeitar estéril, luego se almacenaron en fundas de papel kraft etiquetadas, estas a su vez se empaquetaron en bolsas de plástico con cierre. Se añadió silica gel para deshidratar el tejido vegetal y evitar la degradación de los ácidos nucleicos como lo indica Cruz, Anaya, Montero, y Ruiz (2017), finalmente se transportó las muestras en un recipiente térmico a 4°C (Instituto Nacional de Biodiversidad, 2008). Las muestras de flores se recolectaron y depositaron en fundas de papel kraft etiquetadas, se transportaron en un recipiente térmico a 4°C. Las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Politécnica Salesiana, de Quito. El tejido vegetal fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento para evitar la degradación y oxidación como lo refiere Cadavid, García y Uribe (2013).

2.2 Análisis molecular

2.2.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó aplicando las directrices de la guía del usuario del Kit “Phire Plant direct PCR” para protocolo directo de hojas de plantas, el cual consistió en usar pequeñas muestras de tejido vegetal tomadas con un punzón que corta discos de un diámetro de 0.5 mm y depositarlas en microtubos *Eppendorf*TM de PCR de 0.5 mL. Otro método para obtener muestras de tejido vegetal consiste en cortar con un bisturí segmentos de hoja de entre 0.35 – 0.50 mm (Thermo Fisher Scientific, 2018). El punzón y el bisturí se limpiaron con cloro al 2% y alcohol de 96 % v/v después del corte de cada especie para prevenir la contaminación cruzada.

Luego se añade la solución formada por el Buffer 2X Phire Plant PCR, los Primers Forward y Reverse, DMSO, líquido para disolución y agua libre de Nucleasas como lo refiere el protocolo de *Thermo Fisher Scientific* (2018), ver Tabla 1. La mezcla se la prepara sobre un termo bloque frío *LightCycler*[®] *Centrifuge Adapters*. La preparación debe agitarse con un agitador vórtex para obtener una mezcla uniforme y después se utilizó una mini centrifuga *Sprout*TM para que la solución de PCR y la muestra de hoja se depositen en el fondo del tubo Eppendorf.

Es recomendado el uso de DMSO según Martínez, De la Cruz, Cortes, Cadena y Zamarrón (2012) como agente estabilizante de estructuras secundarias evitando la interferencia durante la polimerización regulando la estabilidad de la cadena simple de ADN y la actividad catalítica de la ADN polimerasa.

Tabla 1.

Preparación de la mezcla PCR con Phire Plant Direct PCR Master Mix

Reactivos	Volumen para 1 muestra
2X Phire Plant PCR Buffer	12.5 µL
Primer <i>matK</i> 2.1a Forward (1 Mm: 5'-ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC)	0.5 µL
Primer <i>matK</i> 2.1a Reverse (1 Mm: 5' GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG)	0.5 µL
Dilution Protocol	1.25 µL
DMSO	0.5 µL
Nuclease-free water	8.75 µL
ADN	1 µL
Total	25 µL

Fuente: Modificado de *Thermo Fisher Scientific* (2018).

2.2.2 Amplificación

Las condiciones de temperatura para la amplificación mediante la técnica PCR convencional fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94 °C por 2 min, luego 35 ciclos de: 30 s a 94°C para la desnaturalización, 30 s a 53°C para la hibridación, 40 s a 72 °C para la elongación y 5 min a 72°C para la elongación final, de acuerdo con la técnica descrita por Iza (2018); el procedimiento se lo llevó adelante en un termociclador *Multigene™ OptiMac Thermal Cyclers*.

2.2.3 Estimación del ADN

Los amplicones obtenidos por el método PCR se evaluaron mediante la técnica electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% ; para lo cual se utilizó 0.5 g de *UltraPure™ Agarose* + 50 mL de TBE 1X (TBE 10X: Tris base 54 g, ácido bórico 27.5 g y 2.93 g de EDTA 0.5 M); la mezcla contenida en un matraz de 250 mL se calienta en un microondas durante 40 segundos, cuando la temperatura baja a unos 40°C se añade 5 µL del fluoróforo *SYBR® Safe DNA Gel Stain*, se agita durante 5 segundos; el gel preparado se coloca en el recipiente de la cámara de electroforesis

Labnet Gel – XL al cual se le añade un peine para 14 pocillos, de acuerdo a la técnica descrita por Fuertes y Mallitasig (2018).

Para cuantificar el tamaño de la cadena de ADN y su concentración se utilizó el marcador molecular *O'GeneRuler Express DNA Ladder* (100 a 5000 pb y 40 – 100 ng / 0.5 µg), método sugerido por la empresa MACROGEN Inc., para recibir las muestras que serán secuenciadas.

En el gel de agarosa solidificado se colocó en el primer pocillo 3 µL del marcador molecular, en los pocillos restantes se inoculó 3 µL de las muestras de ADN amplificado. La cámara electroforética fue programada a 90 voltios durante 40 minutos, los resultados fueron visualizados con luz ultra violeta en el foto documentador *MicroBis DNR Bio-imaging systems*, técnica descrita por Rivas y Salazar, (2017).

2.2.4 Secuenciación

Los productos resultantes de la PCR fueron purificados y luego secuenciados mediante la técnica Sanger automatizada para la identificación de los nucleótidos en la empresa *Humanizing Genomic Macrogen* ubicada en Corea del Sur; para lo cual se envió 20 µL, con una concentración entre 20-100 µg / µL (determinado mediante comparación visual con el marcador molecular *O'GeneRuler Express DNA Ladder #SM1563*). Las muestras se enviaron en microtubos *Eppendorf* de 1,5 µL, etiquetados con un código, sellados con parafilm y empacados en fundas plásticas con cierre *Ziploc*®.

2.2.5 Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron evaluadas mediante el software *FinchTV* se aceptaron secuencias con una calidad sobre el 95 % (Digital World Biology, 2017).

Posteriormente las secuencias fueron analizadas con el algoritmo *BLAST* de *GenBank* el cual indica el nivel de similitud con las secuencias almacenadas en su biblioteca genómica.

2.2.6 Análisis Filogenético

El análisis filogenético se desarrolló a través de un árbol filogenético elaborado con las secuencias validadas < 95%, las cuales fueron editadas eliminando los extremos de las cadenas que presentan problemas de lectura o ruido, a continuación se alinean las cadenas utilizando el algoritmo *MUSCLE* del software *MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)*; con estos datos se construyó el árbol filogenético bajo el modelo *Maximum Likelihood, Bootstrap* con 1000 réplicas, con el modelo estadístico *Jukes-Cantor*, que evalúa la probabilidad de sustituciones nucleotídicas a través de la distancia entre secuencias (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013)

2.2.7 Georreferenciación

Las coordenadas geográficas de las ubicaciones de cada especie fueron obtenidas de la base de datos Tropicos (2018) y de las referencias dadas mediante conversación personal con Alex Hirtz. Los datos fueron procesados en el programa DIVA-GIS Versión 7.5 desarrollado por Hijmans, Guarino, & Mathur (2012) con el cual se establece un mapa de la ubicación de las especies para ser correlacionado con la información filogenética y establecer puntos de diversificación.

2.3 Análisis químico de los aromas florales

2.3.1 Preparación de muestras

El material floral fresco obtenido de las especies del género *Caucaea* consistió en pétalos y callos cortados en pedazos pequeños con una tijera estéril, del cual se dispuso

2.4 g en tubos de ensayo con tapa rosca estériles y luego se añadió 2 mL de diclorometano (CH_2Cl_2).

2.3.2 Extracción asistida por ultrasonido

Para incrementar la eficiencia y reducir el tiempo de extracción, las muestras preparadas se depositaron en el Ultrasonido *Fisher Scientific* FS60D durante 30 minutos a una temperatura de 30°C de acuerdo con la técnica descrita por Acosta, Salomón, Sevilla, y Nuevas, (2016).

2.3.3 Filtración de muestras y preparación de viales

Después del procedimiento en el ultrasonido las muestras son tamizadas en filtros PVDF de 0.45 μm acoplados a jeringas de 1 mL, como indica Cervantes (2013), para purificar las muestras y evitar el paso de partículas no deseadas que pudieran tapan la columna del cromatógrafo de gases. Inmediatamente se depositó el extracto en viales de rosca de vidrio ámbar de 2 mL estériles y etiquetados para después ser analizados.

2.3.4 Identificación de los componentes químicos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Para el análisis de los compuestos químicos resultantes de la extracción sólido-líquido de las muestras florales se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a masas GC-MS modelo *EVOQ-GC 436* acoplado a un espectrómetro de masas marca *Bruker* modelo *TQ-MS* cuyas condiciones fueron: corriente de emisión 10 μAmp , voltaje de ionización 70 eV, rango de masas 40-600 Da, velocidad de barrido 1 scan/min, temperatura de trampa 220°C, temperatura de transferencia 260 °C. La columna empleada fue DB5 (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 μm). Como gas transportador se utilizó He a un flujo de 1 mL/min; se inyectó en modalidad Split 1:50. El programa de temperatura para la columna se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2.

Programa de temperatura para la columna

Temperatura Inicial	Incremento	Tiempo	Temperatura final
50 °C	1°C/min	50 min	100 °C
100 °C	5°C/min	30 min	250 °C
250 °C	-	10 min	250°C

Fuente: (Agilent Technologies, 2010)

La identificación de los compuestos químicos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de los espectros de masa obtenidos con los datos de la biblioteca espectral de masas NIST.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Recolección de muestras

Las muestras vegetales recolectadas del género *Caucaea* presentes en el Ecuador se obtuvieron de 7 colecciones, las cuales fueron: Jardín botánico “Orquídeas de Sarina” (El Quinche – 7 muestras), “Jardín Botánico Quito” (7 muestras), Colección de Alex Hirtz (Quito – 37 muestras), Colección de Francisco Tobar (Quito – 4 muestras). En Azuay “Ecuafior” (12 muestras), “Ecuagenera Orquídeas del Ecuador” (22 muestras) y en “Mundiflora” (9 muestras), obteniendo un total de 98 muestras para el estudio filogenético, ver Tabla 3.

Tabla 3.

Listado de especies del género *Caucaea* (*Orchidaceae*) utilizadas para análisis filogenético.

Número de muestras	Código de Colección	Nombre científico	Lugar de colección
1	3778	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
2	3779	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
3	3780	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
4	3781	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
5	3782	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
6	3783	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
7	3784	<i>Caucaea cucullata</i>	Orquídeas de Sarina
8	3785	<i>Caucaea sanguinolenta</i>	Jardín Botánico Quito
9	3786	<i>Caucaea olivácea</i>	Jardín Botánico Quito
10	3787	<i>Caucaea nubigena</i>	Jardín Botánico Quito
11	3788	<i>Caucaea sanguinolenta</i>	Jardín Botánico Quito
12	3789	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Jardín Botánico Quito
13	3790	<i>Caucaea olivacea</i>	Jardín Botánico Quito
14	3791	<i>Caucaea olivacea</i>	Jardín Botánico Quito
15	3792	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Alex Hirtz
16	3793	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Alex Hirtz
17	3794	<i>Caucaea dayana</i>	Alex Hirtz
18	3795	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Alex Hirtz
19	3796	<i>Caucaea doblaratum</i>	Alex Hirtz
20	3797	<i>Caucaea hernandezii</i>	Alex Hirtz
21	3798	<i>Caucaea hernandezii</i>	Alex Hirtz
22	3799	<i>Caucaea cucullata</i>	Alex Hirtz

23	3800	<i>Caucaea tripterygia</i>	Alex Hirtz
24	3801	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Alex Hirtz
25	3802	<i>Caucaea sp. nov. acaroi</i>	Alex Hirtz
26	3803	<i>C. chimborazoensis</i>	Alex Hirtz
27	3804	<i>Caucaea macrochilum</i>	Alex Hirtz – El corazón
28	3805	<i>Caucaea macrochilum</i>	Alex Hirtz – El corazón
29	3806	<i>Caucaea macrochilum</i>	Alex Hirtz – El corazón
30	3807	<i>Caucaea macrochilum</i>	Alex Hirtz – El corazón
31	3808	<i>Caucaea macrochilum</i>	Alex Hirtz – El corazón
32	3810	<i>C. chimborazoensis</i>	Alex Hirtz
33	3811	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	Alex Hirtz
34	3812	<i>Caucaea nubigena</i>	Alex Hirtz
35	3813	<i>Caucaea cucullata</i>	Alex Hirtz
36	3814	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Alex Hirtz
37	3815	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Alex Hirtz
38	3816	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Alex Hirtz
39	3817	<i>Caucaea hernandezii</i>	Alex Hirtz
40	3818	<i>Caucaea nubigena</i>	Alex Hirtz
41	3819	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Alex Hirtz
42	3820	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Alex Hirtz
43	3821	<i>Caucaea nubigena</i>	Alex Hirtz
44	3822	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Alex Hirtz
45	3823	<i>Caucaea cf. cucullata</i>	Alex Hirtz
46	3824	<i>Caucaea nubigena</i>	Alex Hirtz
47	3825	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Alex Hirtz
48	3826	<i>Caucaea sp. nov. saraguro</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
49	3827	<i>C. nubigena (Cañar)</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
50	3828	<i>C. nubigena (Santa Isabel)</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
51	3829	<i>C. universitas-cuencae</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
52	3830	<i>Caucaea azuayensis</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
53	3831	<i>Caucaea azuayensis</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
54	3832	<i>Caucaea dayana</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
55	3833	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
56	3834	<i>Caucaea nubigena</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
57	3835	<i>Caucaea nubigena alba</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
58	3836	<i>C. aff. sanguinolenta</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
59	3837	<i>Caucaea nubigena alba</i>	Mario Portilla-Ecuaflore
60	3838	<i>Caucaea cucullata</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
61	3839	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
62	3840	<i>Caucaea nubigena</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
63	3841	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
64	3842	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
65	3843	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
66	3844	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
67	3845	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
68	3846	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
69	3847	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
70	3848	<i>Caucaea nubigena</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera

71	3849	<i>Caucaea nubigena</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
72	3850	<i>Caucaea nubigena</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
73	3851	<i>Caucaea nubigena</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
74	3852	<i>Caucaea nubigena</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
75	3853	<i>Caucaea rhodosticta</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
76	3854	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
77	3855	<i>Caucaea cf. phalaenopsis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
78	3856	<i>Caucaea cf. cucullata</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
79	3857	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
80	3858	<i>Caucaea cf. phalaenopsis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
81	3859	<i>Caucaea cf. phalaenopsis</i>	Pepe Portilla-Ecuagenera
82	3860	<i>Caucaea radiata</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
83	3861	<i>Caucaea sanguinolenta</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
84	3862	<i>Caucaea mimetica</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
85	3863	<i>Caucaea nubigena (Jimbura)</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
86	3864	<i>Caucaea cf. nubigena</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
87	3865	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
88	3866	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
89	3867	<i>Caucaea nubigena sp.</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
90	3868	<i>Caucaea cucullata</i>	Iván Ácaro-Mundiflora
91	3994	<i>Caucaea pichincae</i>	Alex Hirtz
92	3995	<i>Caucaea pichincae</i>	Alex Hirtz
93	3996	<i>Caucaea andreetana</i>	Alex Hirtz
94	3997	<i>Caucaea cf. chilla</i>	Alex Hirtz
95	3998	<i>Caucaea sp. nov. chilla</i>	Francisco Tobar
96	3999	<i>Caucaea sp. nov. chilla</i>	Francisco Tobar
97	4000	<i>Caucaea sp. nov. chilla</i>	Francisco Tobar
98	4001	<i>Caucaea tarquiensis</i>	Francisco Tobar

Código de colección guardado en el libro de campo de Marco Cerna 2018.

Fotos: Número de muestra: 1-7 Marco Cerna; 8-14 Luis Baquero; 15-94 Alex Hirtz; 95-98 Francisco Tobar, ver Anexo 1.

Elaborado por: Los autores, 2019.

3.2 Análisis molecular

3.2.1 Extracción de ADN

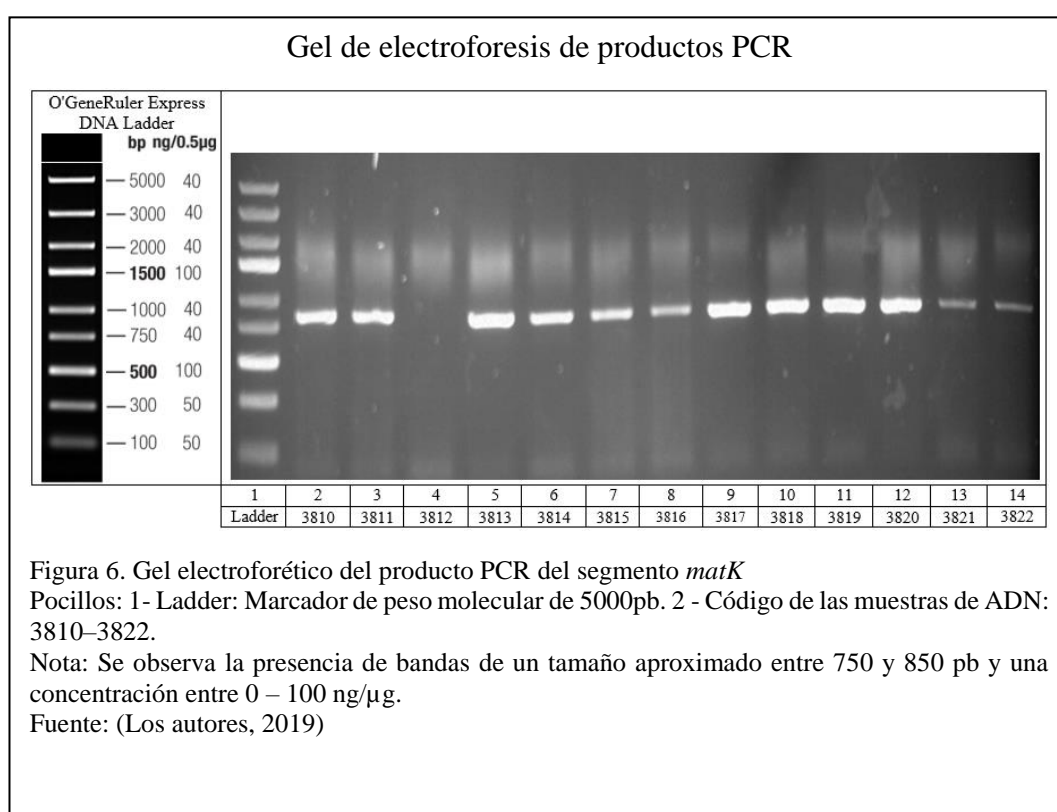
Se obtuvo ADN de las 98 muestras colectadas mediante la aplicación del protocolo directo para hojas de plantas del Kit “*Phire plant direct PCR*”, el cual permite preparar directamente las muestras para iniciar el proceso de amplificación según la técnica descrita por Iza (2018).

3.2.2 Amplificación

Se amplificó el 100% de las muestras con el marcador molecular *matK* 2.1a. La temperatura de hibridación fue de 53°C para amplificar la región *matK* en su totalidad sin evidenciar la presencia de doble banda, ver Figura 6.

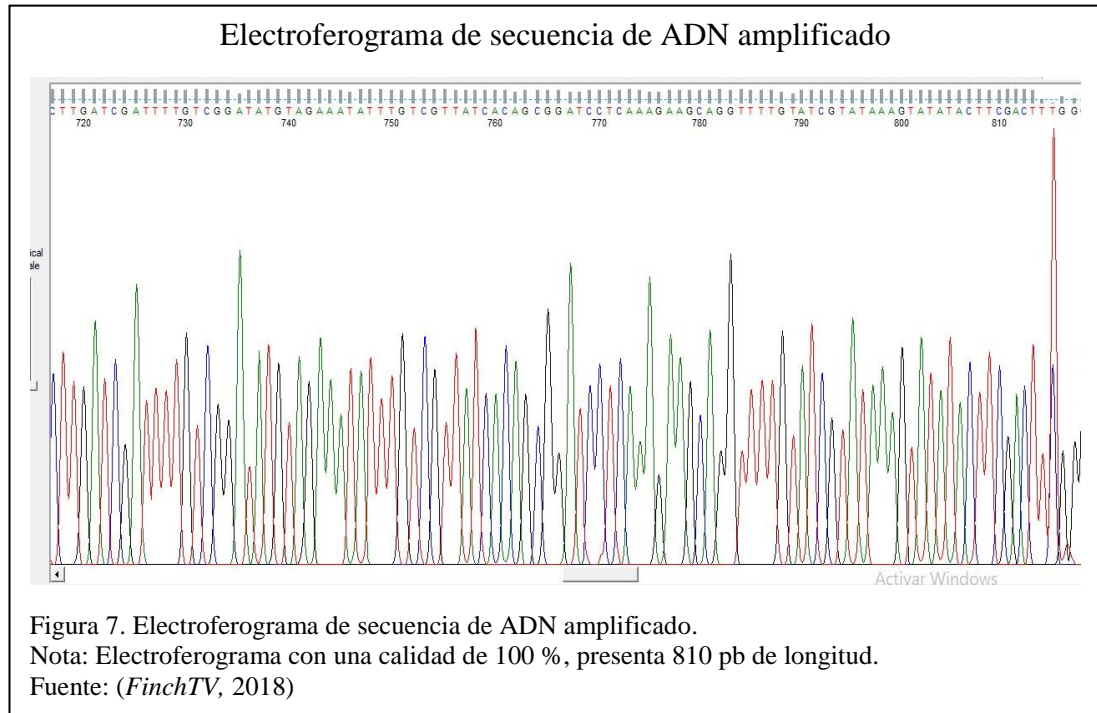
3.2.3 Estimación del ADN

Los resultados de las amplificaciones de PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. Las longitudes de las moléculas de ADN presentan cadenas sobre los 750 pb con una concentración aproximada de 40 – 100 µg / 0.5 µg, los resultados son similares a los obtenidos por Iza (2018) en su trabajo “Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula*” y Miño (2018) en su trabajo “Identificación molecular del género *Passiflora*”, ver Figura 6.



3.2.4. Secuenciación

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron por el método Sanger, para la región *matK* se enviaron 98 muestras y se obtuvieron 92 secuencias con una calidad mayor al 95 % las cuales presentan una longitud media de 760 pb.



3.2.5. Análisis Bioinformático

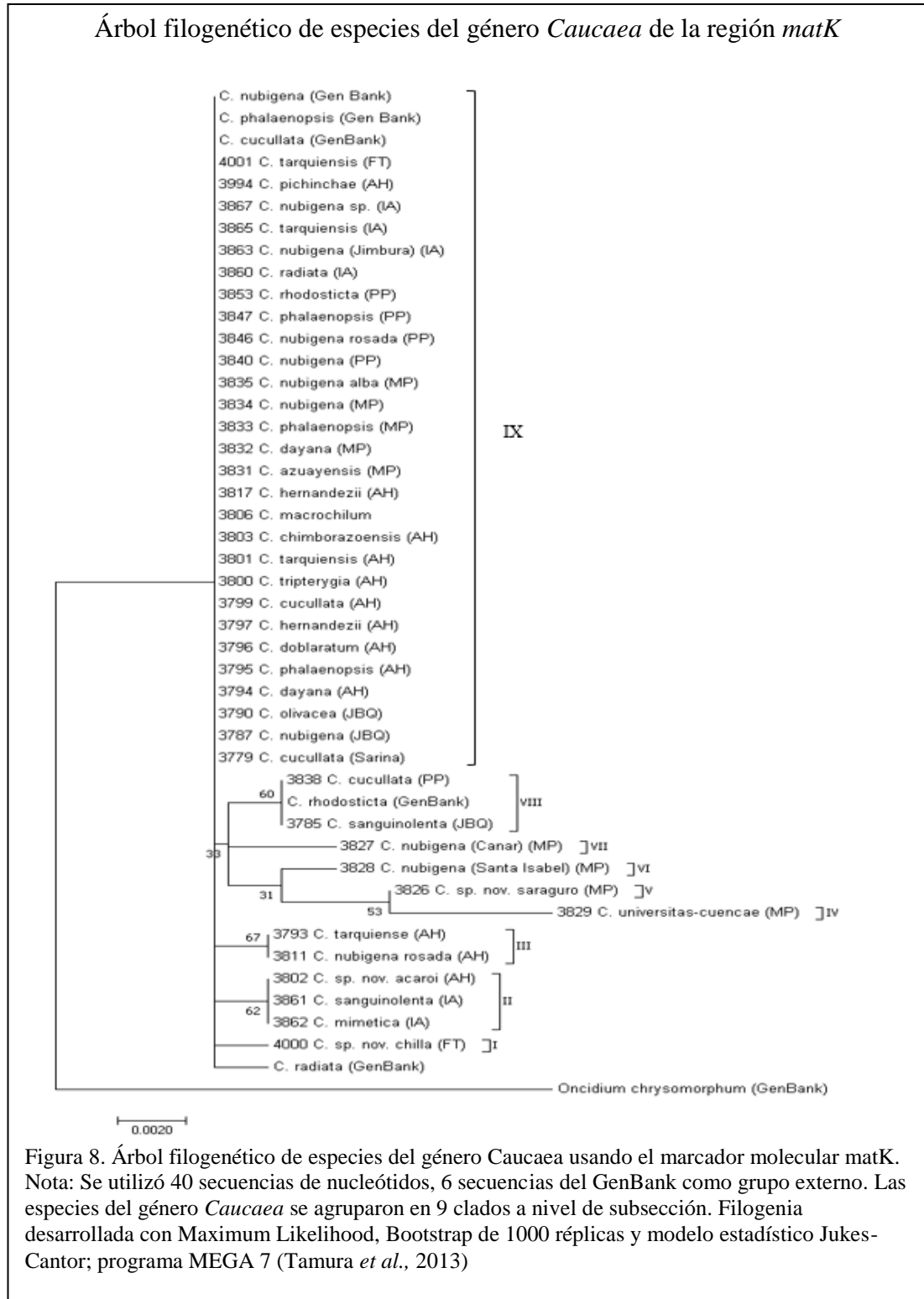
En la base de datos de secuencias genéticas *GenBank* existe el registro de 7 secuencias del gen *matK* para las especies: *C. cucullata*, *C. phalaenopsis*, *C. radiata*, *C. kennedyi*, *C. andigena*, *C. rhodosticta* y *C. nubigena*, las secuencias de especies que se encuentran en el Ecuador no están registradas en la base de datos de *GenBank*.

Las secuencias también fueron analizadas en el software *BoldSystems* en el cual no se han ingresado secuencias del género *Caucaea*.

3.2.6. Análisis filogenético

El árbol filogenético obtenido bajo el modelo *Maximum Likelihood*, *Bootstrap* con 1000 réplicas y modelo estadístico *Jukes-Cantor* correspondiente al marcador *matK* se elaboró con 92 secuencias de los individuos muestreados; en este árbol se observa 9

clados para el género *Caucaea*; se añadió como grupo externo la secuencia de la especie *Oncidium chrysomorphum* y 5 secuencias del género *Caucaea* obtenidas de la base de secuencias génicas *GenBank*, ver Figura 10.



Descripción de los grupos, ver Figura 8.

- Clado (I): *Caucaea sp. nov. chilla*.
- Clado (II): *C. sp. nov. acaroi*, *C. sanguinolenta*, *C. mimetica*.
- Clado (III): *C. tarquiense*, *C. nubigena rosada*.
- Clado (IV): *Caucaea universitas-cuencae*.
- Clado (V): *Caucaea nubigena (Saraguro)*.
- Clado (VI): *Caucaea nubigena (Santa Isabel)*.
- Clado (VII): *Caucaea nubigena (Cañar)*.
- Clado (VIII): *C. cucullata*, *C. sanguinolenta*.
- Clado (IX): *C. tarquiensis*, *C. nubigena (Jimbura)*, *C. radiata*, *C. rhodosticta*, *C. phalaenopsis*, *C. azuayensis*, *C. macrochilum*, *C. olivacea*, *C. dayana*, *C. doblaratum*, *C. hernandezii*, *C. tripterygia*, *C. chimborazoensis*, *C. cucullata*.

Los clados (I), (V), (VI), (VII) se ubican en sectores aislados del árbol filogenético lo que muestra su diferencia del resto de especies; estos individuos podrían constituirse como especies nuevas.

El clado (II) conformado por *C. sanguinolenta*, *C. mimetica* y *C. sp. nov. Acaroi*; de acuerdo a información descrita por Stacy (1970), en su trabajo “Estudios en el género *Oncidium* I” estas especies comparten características a nivel del callo, presentando cinco tubérculos subglobosos en tres filas, además un callo largo y surcado que es tridentado en el ápice. Estas especies fueron agrupadas por parte de Lindley, (1841) en su trabajo “Sertum Orchidaceum” en una sola especie: *Oncidium cucullatum*, tomando en cuenta el hábito de crecimiento y la estructura del callo. Por otro lado *C. sp. nov. acaroi* podría ser un híbrido entre ambas especies debido a no se han encontrado otros individuos en el campo.

El clado (III) conformado por *C. tarquiensis* y *C. nubigena* las cuales comparten características similares en su morfología como el sépalo dorsal elíptico, sépalos laterales basales connados, pétalos elípticos y un labelo trilobulado; tomando en cuenta que su distribución geográfica está en la provincia del Azuay, su principal diferencia es el callo subcuadrado para *C. tarquiensis* y un callo largo para *C. nubigena*.

El clado (IV) está conformado por *C. universitas-cuencae* descrita por Königer y Vázquez (2003), colectada en la provincia del Cañar en el cantón El Tambo a 2800 msnm. En la base de datos Tropicos (2018) la especie está catalogada como no válida.

El clado (IX) conformado por especies de los grupos *Nubigena*, *Phalaenopsis*, *Cucullata* y *Radiata* presentan un bajo nivel de divergencia entre ellos.

El estudio filogenético con la región *matK* resultó útil para la agrupación de las secuencias en distintos clados. Muller *et al.* (2006) indica que el gen *matK* es uno de los marcadores moleculares más utilizados para estudios sistemáticos y evolutivos. Según Dong, Liu, Yu, Wang y Zhou (2012) indican que la región *matK* posee baja variabilidad nucleotídica debido a la reducida tasa de variabilidad del gen. En la investigación realizada por Pinedo, Benavides, González, Sánchez & Ruiz (2018) concluyen que la capacidad de detección de *matK* no es suficiente para identificar la totalidad de las especies dentro de los géneros *Oncidium*, por lo tanto, a pesar de que *matK* presente una buena resolución para la mayoría de las orquídeas, no logró resolver agrupaciones a nivel de especie en los géneros *Oncidium* y *Cattleya*.

3.2.7 Georreferenciación

Se realizó la georreferenciación de las especies del género *Caucaea* distribuidas en el Ecuador, ver Tabla 4. Se Utilizó el software *DIVA-GIS* permitiendo relacionar los puntos de diversificación geográfica con los resultados filogenéticos, ver Figura 9.

Tabla 4.

Tabla de Georreferencias de muestras de *Caucaea*

Especie	Latitud	Longitud	Código	Ubicación
<i>C. sp.nov. acaroi</i>	-0.1694	-78.4908	A	La mañosca
<i>C. cucullata</i>	-0.0645	-78.3254	B	El quinche
<i>C. cucullata</i>	0.1493	-78.3448	C	Mojanda
<i>C. cucullata</i>	0.9849	-78.2962	D	Carchi
<i>C. sp.nov. chilli</i>	-3.4644	-79.5922	E	Chilla
<i>C. hernandezii</i>	-0.4772	-77.8991	F	Baeza
<i>C. macrochilum</i>	-0.5405	-78.6751	G	Aloasi
<i>C. mimetica</i>	-2.9326	-79.0707	H	Azuay - Mundiflora
<i>C. olivacea</i>	-0.885	-78.096	I	Napo
<i>C. pichincha</i>	0.0898	-78.182	J	Cochasqui
<i>C. cf. rhodosticta</i>	-2.8058	-78.7554	K	Azuay - Ecuagenera
<i>C. sanguinolenta</i>	-2.9326	-79.0707	H	Azuay - Mundiflora
<i>C. sp. nov. saraguro</i>	-3.6247	-79.2344	L	Saraguro
<i>C. universitas-cuencae</i>	-2.5083	-78.9175	M	El Tambo
<i>C. azuayensis</i>	-2.8466	-79.0994	N	Azuay
<i>C. chimboraensis</i>	-1.453	-79.018	O	Guaranda
<i>C. nubigena (Cañar)</i>	-2.3677	-78.803	P	Cañar
<i>C. nubigena (Jimbura)</i>	-4.6311	-79.4525	Q	Jimbura
<i>C. nubigena (Santa Isabel)</i>	-3.293	-79.3211	R	Santa Isabel
<i>C. nubigena rosada</i>	-2.8088	-78.9997	S	Checa alto
<i>C. tarquiensis</i>	-2.8753	-78.9274	T	Tarqui
<i>C. radiata</i>	-4.0113	-79.2166	U	Loja
<i>C. dayana</i>	-4.4113	-79.3746	V	Loja
<i>C. phalaenopsis</i>	-4.4113	-79.3746	V	Loja
<i>C. tripterygia</i>	-4.4113	-79.3746	V	Loja

Nota: Se ubican 21 puntos de distribución de especies del género *Caucaea* en el Ecuador. Se relaciona el código con la ubicación de las especies muestreadas para el análisis de filogenia.

Distribución de especies del género *Caucaea* en el Ecuador

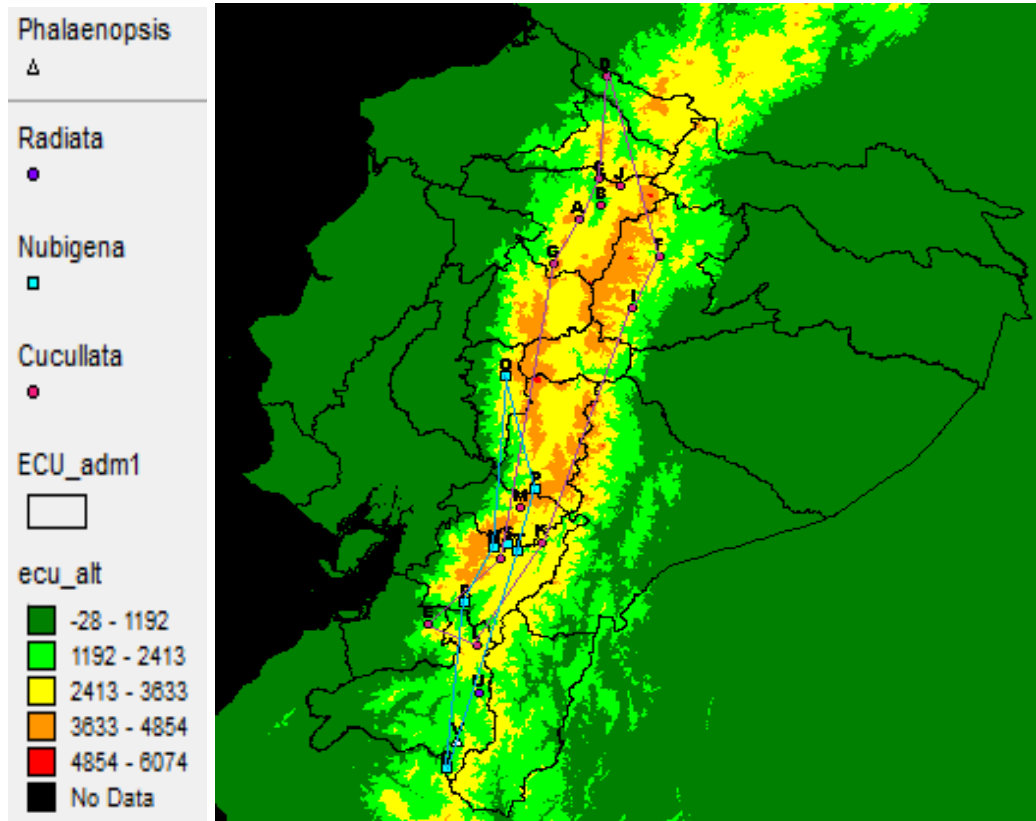


Figura 9. Distribución de especies del género *Caucaea* en el Ecuador
Fuente: (Los Autores, 2019)

En la Figura 9 se puede observar las zonas de distribución de las especies del género *Caucaea*, en el mapa se distinguen polígonos que señalan la distribución de las especies: *C. cucullata*, *C. macrochilum* y *C. Pichincae* se ubican en la zona Norte en las provincias de Pichincha y Carchi; *C. hernandezii* y *C. olivaceae* se ubican en la provincia del Napo por lo que se considera que este grupo de especies variantes del grupo *Cucullata* han desarrollado una especiación alopátrica como lo describe Boucher, Zimmermann, y Conti (2015). Especies como *C. universitas-cuencae* en el Tambo – Cañar, *C. sp. nov. saraguro* en Loja y *C. sp. nov. chilla* en el Oro se encuentran aisladas geográficamente del grupo *Cucullata* cuya extensión es la zona norte del Ecuador evidenciando de esta manera la especiación peripátrica como lo

describe Cuevas (2012) ; además en el árbol filogenético se observa la separación de estas especies en diferentes clados sin embargo mantienen características morfológicas propias del grupo. *C. sp. nov. acaroi* perteneciente a la colección privada de A. Hirtz en la Mañosca – Quito podría ser un híbrido entre *C. sanguinolenta* y *C. mimetica* producto de la domesticación de las especies lo cual se evidencia por agrupamiento en un mismo clado.

C. nubigena (Cañar), *C. azuayensis*, *C. nubigena* (Santa Isabel), *C. nubigena rosada* y *C. tarquiensis* se distribuyen en la provincia del Azuay, la especiación simpátrica descrita por Saldamando (2010) se evidencia en este caso demostrando una tasa de divergencia en un mismo espacio geográfico. Las especies *C. chimborazoensis* y *C. nubigena* (Jimbura) pertenecientes al grupo *Nubigena* presentan una especiación peripátrica por aislamiento geográfico producto de fenómenos de dispersión y colonización como lo indica Perfectii (2002).

Especies del grupo *Phalaenopsis* como *C. tripterigya*, *C. dayana* muestran una especiación simpátrica al no presentar una separación geográfica completa entre poblaciones ya que su extensión se limita a la zona centro sur de Loja.

Especies del grupo *Cucullata* se encuentran distribuidas principalmente en la zona norte del Ecuador en las provincias de Pichincha y Carchi. Las especies del Grupo *Nubigena* se encuentran distribuidas hacia el sur en las provincias de Cañar, Azuay y Loja. En la figura 10 se puede observar la formación de agrupaciones de acuerdo al lugar de colección, los códigos (MP, PP, IA) para la zona sur y (Sarina, JBQ, AH) para la zona norte y centro demuestran que el medioambiente en el cual se establecen las especies juega un papel muy importante en su desarrollo, tomando en cuenta la variabilidad epigenética en poblaciones naturales, estudios por parte de Kilvits, Alvarez, Foust y Aaron (2013), hacen referencia a mecanismos moleculares que

provocan la alteración de la expresión génica sin alterar la secuencia de bases nitrogenadas siendo un factor de la plasticidad fenotípica heredable. La metilación del ADN entre los factores más estudiados inducen alteraciones fenotípicas rápidas, modificaciones o transformación de los órganos florales y la inhibición de la maduración de los frutos (Covelo, 2015). En un estudio realizado en el género *Dactylorhiza* por Paun *et al.* (2010), demuestra que la divergencia epigenética se relaciona con las diferencias ecológicas.

Las especies en estudio al encontrarse a una altura entre los 2600 y 3400 m.s.n.m. tienen una mayor captación de radiación UV, según la investigación de Chase y Palmer (1988), sugieren que la radiación adaptativa influye en numerosos cambios en los caracteres morfológicos y estructurales que tienen un valor adaptativo. Sandoval *et al.* (2010), coinciden con el concepto de radiación en *Oncidiinae* al mencionar cambios morfológicos como la presencia de hipodermis adaxial en estratos discontinuos, un mesófilo diferenciado en empalizada y esponjoso para captar mayor cantidad de luz, entre otros, son ejemplos de modificaciones estructurales presentes en clados de *Oncidiinae*.

Martínez (2002) establece que la radiación adaptativa provoca cambios estructurales de forma inmediata para que las especies logren adaptarse y sobrevivir a las adversidades ambientales que se presente, por este motivo, dichas alteraciones morfológicas no se ven reflejadas en modificaciones de su información genética y al realizar estudios filogenéticos conservan la información de su ancestro común.

Árbol filogenético de todos los individuos colectados del género *Caucaea* para la región *matK*

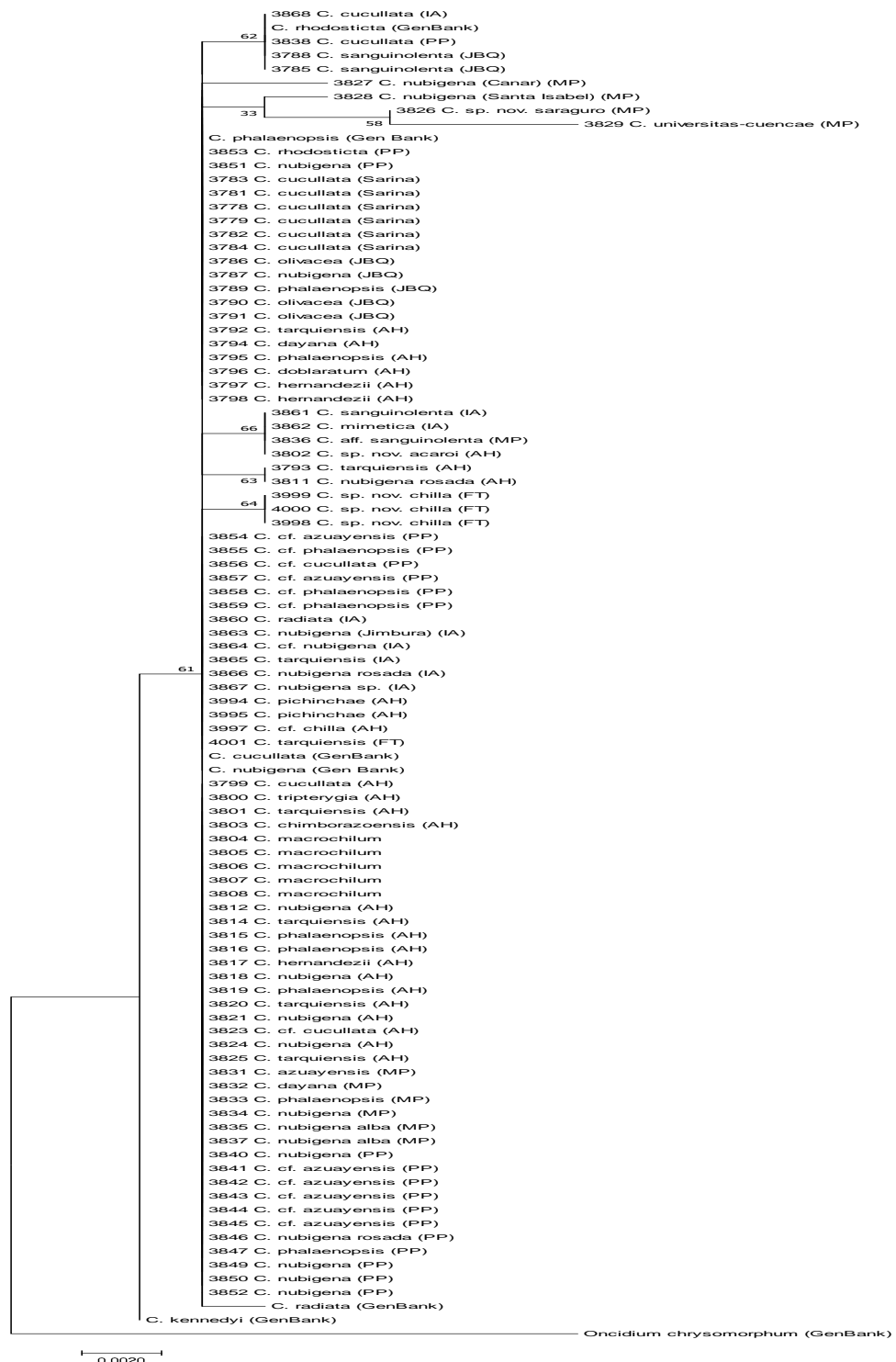


Figura 10. Árbol filogenético de todos los individuos recolectados del género *Caucaea* para la región *matK*.

Nota: Para el análisis se utilizó 92 secuencias de nucleótidos, 7 secuencias del GenBank como grupo externo. Las especies del género *Caucaea* se agruparon en 9 clados a nivel de subsección.

Fuente: Datos obtenidos del programa MEGA 7 (Tamura *et al.*, 2013)

3.3 Análisis químico de los aromas florales

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permite obtener cromatogramas en los cuales se evidencian los diferentes compuestos presentes en cada especie analizada. Según el tiempo de retención se puede identificar el tipo de compuesto, y de acuerdo al área bajo la curva se determina la abundancia relativa del compuesto (León, 2006).

Se analizó la composición química de los compuestos volátiles de 8 especies del género *Caucaea*, cuyos resultados generales se encuentran representados en la tabla 5, donde se indican los 95 compuestos identificados con sus respectivos tiempos de retención y porcentaje de abundancia relativa en cada especie. La mayoría de compuestos forman parte de los hidrocarburos, Stashenko y Martínez (2014) mencionan que uno de los principales grupos que se encuentran en la mayoría de emisiones florales son los hidrocarburos seguidos de los terpenos, y su función principal es emitir fragancias florales que promuevan la polinización cruzada.

Grajales *et al.* (2011) mencionan que los hidrocarburos alifáticos, olefínicos y cicloparafinas junto con los ácidos grasos forman parte de la capa de cera protectora que cubre los pétalos de muchas de las flores de la familia *Orchidaceae*, como mecanismo de defensa.

De manera particular, *C. cucullata* 3799 contiene 26 compuestos químicos (tabla 5), los más representativos son: el ácido oleico 7.83% (ácido trans-13-octadecanoico), Bisfenol AF 5.52% (4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol) y el heneicosano 2.2%. En investigaciones del género *Vanilla* realizadas por León (2006) indica que el ácido oleico, después de la vainillina, es uno de los principales componentes presentes en los compuestos de la orquídea *Vainillina*, la cual ha sido cotizada porque a partir de su fruto se obtiene el saborizante conocido como vainilla.

Los compuestos que únicamente están presentes en *C. cucullata* (3799) son glyceryl Monooleate, 2,6-dimethyldecane, 2-methyloctadecane, 5,5,7,7-Tetraethylundecane, Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-3-methylene, los ácidos carboxílicos oleico y palmítico, y el α – Thujenol.

En el caso de *C. nubigena rosada* (3811) se identificaron 13 compuestos, los más representativos son el Methylene DI-T-butylcresol 19.27%, bis(2-ethylhexyl) hexanedioate 14.03% y Mono (2-ethylhexyl) adipate 7.13%, que pertenecen al grupo de los hidrocarburos. Además, estos compuestos son característicos de esta especie.

En el caso de *C. cucullata* (3813) se identificaron 37 compuestos, siendo los más representativos el tetracontane 6.32%, docosano 5.92% y (1-Cyclohexen-1-ylmethyl) benzeno 4.02%. Mientras que los compuestos propios de la especie son el docosano, octadecano, tetradecano, 2,2-Dimethyloctadecane, 2,5-Dimethyltetradecane, 4-Methyltetradecane, 3,5,24-Trimethyltetracontane, Methyl tetradecanoate, 1,2,4,5-tetramethylbenzene, P-Cymene y 2,6,6-trimethyldecane. Hernández (2003) menciona que el p-cimeno se encuentra presente en varios aceites esenciales, el cual posee actividad antimicrobiana y antifúngica.

El análisis de *C. nubigena* (3787) muestra 28 compuestos de los cuales los más representativos son el Tetracontano 20.27%, Diisooctyl phthalate 19.45%, Nonacosano 18.66%, Bis(2-ethylhexyl) phthalate 15.55%. Mientras que los compuestos propios de la especie son el dotetracontano, 3-methylundecano, 1-Phenylbicyclo 4.1.0, heptane, Bis (2-ethylhexyl) phthalate y el 2,5-DI-Tert-butylphenol.

C. mimetica (3862) presenta 23 compuestos los más representativos son pentatriacontano 20.49%, heptacosano 11.98%, Diisooctyl phthalate 13.91%. Los

compuestos característicos de esta especie son 3',8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone y el indole.

En el caso de *C. cucullata* (3778) únicamente se evidencia dos compuestos que son (4-Hydroxyphenyl) phosphonic acid 34.73% e Isobutyraldehyde Oxime 1.41%. Lo mismo sucede con *C. tarqiensis* (3792) que presenta 7 compuestos de los cuales la mayoría son característicos de esta especie, el que se encuentra en mayor porcentaje es el heptano. Finalmente, *C. cucullata* (3823) presenta 25 compuestos, los que se encuentran en mayor porcentaje son Heptacosano 11.5%, Dotetracontane 10.68% y Eicosane 6.067%.

Zuñiga (2017) menciona que los compuestos alifáticos y aromáticos tienen como principal función atraer a los polinizadores. Una de las propiedades de los compuestos volátiles es servir como atrayentes de los polinizadores, en el estudio de Borg-Karlson (1985) se identificó que la composición química de la cera de las hojas de la orquídea *Ophrys sphegodes* es similar a la identificada en la feromona de la abeja hembra *Andrena nigroaeneae*; concluyendo que los tres principales compuestos responsables de favorecer la polinización son los alcanos lineales: heptacosano ($C_{27}H_{56}$), tricosano ($C_{23}H_{48}$) y pentacosano ($C_{25}H_{52}$).

En el presente estudio el heptacosano se encuentra en la mitad de las especies analizadas (*C. cucullata* 3799, 3813, 3823) y *C. mimetica* (3862), para el caso del pentacosano únicamente se encuentra presente en *C. cucullata* (3823) y el tricosano en *C. cucullata* (3813 y 3823). Por lo tanto, se puede asumir que *C. cucullata* (3823) puede llevar a cabo el fenómeno de mimetismo químico en el que produce compuestos volátiles para atraer al polinizador *A. nigroaeneae*.

Tabla 5.

Composición química de los compuestos volátiles de 8 especies del género *Caucaea*.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)							
		<i>C. cucullata</i> 3778	<i>C. nubigena</i> 3787	<i>C. tarquiensis</i> 3792	<i>C. cucullata</i> 3799	<i>C. nubigena rosada</i> 3811	<i>C. cucullata</i> 3813	<i>C. cucullata</i> 3823	<i>C. mimetica</i> 3762
ALCANOS LINEALES									
Tricosane	21,47						1,569	3,422	
Pentacosane	21,465							1,238	
Heptacosane	16,529				0,946		0,896	11,494	11,976
Heptane	2,441			81,462					
Eicosane	11,084						1,733	6,067	
Hexacosane	16,825		2,531		1,283		1,428	2,769	1,179
Heptadecane	22,484		0,529		1,026	0,222	0,235	0,948	2,031
Octacosane	16,523		0,449		0,526		0,505	0,731	
Heneicosane	16,831		3,705		2,195				
Hexadecane	20,765		0,542		0,273		0,236		5,3
Nonadecane	17,343				0,346		1,823		4,068
Pentadecane	20,888		0,376		0,289	0,797	1,45	2,975	3,638
Nonacosane	15,333		18,661			0,094			
Dodecane	11,085		0,613			0,182			
Docosane	21,555						5,921		

Dotriacontane	20,889		0,251				1,008		3,237
Tetracontane	32,813		20,271				6,322		
Octadecane	25,678						2,48		
Tetracosane	23,955						0,277	10,574	
Tetradecane	15,031						1,059		
Hentriacontane	11,081		4,328		0,63		1,25		
Dotetracontane	33,027		1,957					10,677	
Pentatriacontane	32,718								20,493
Tritriacontane	22,48								1,406
Glyceryl Monooleate	32,101				1,381				
ALCANOS RAMIFICADOS									
2,6,11-trimethyldodecane	15,33		0,762		0,358				
7-methyl hexadecane	16,301		0,724		0,254				
2,6,10-trimethyl tetradecane	16,151		1,506		0,155	0,096	0,069	0,856	0,955
2,6-dimethyldecane	12,353				0,219				
2-methyloctadecane	21,174				0,27				
5,5,7,7-Tetraethylundecane	29,358				1,121				
7,9-dimethyl hexadecane	17,17				0,211	0,09		6,4	
5-Methyltetradecane	22,481		1,43			0,139	0,37		1,677
5-Ethyldecane	15,03					0,078	1,018		0,884
2,2-Dimethyloctadecane	9,868						0,172		

2,5-Dimethyltetradecane	18,902						0,545		
2,6,6-trimethyldecane	14,088						0,401		
2,6,10-Trimethyltridecane	21,814		0,519				0,416		
2,6,10-Trimethylpentadecane	12,357						0,748		
2,6-dimethylundecane	15,331		0,43						0,568
4,5-Dimethylnonane	11,241		0,295				0,68	1,111	0,657
4,6-Dimethyldodecane	16,829								5,104
2,6-Dimethylheptadecane	15,332		0,535						0,288
2,4,6-Trimethyldecane	11,078							1,929	
2,6,7-Trimethyldecane	10,137						0,398	0,763	
7,7-Diethylheptadecane	30,506							2,924	
4-Methyltetradecane	20,153						0,871		
4-Ethyldecane							0,444		
3,5,24-Trimethyltetracontane	19,089						0,434		
3-Methylundecane	15,548		0,538						
Methyl tetradecanoate	26,13						0,373		
Methyl hexadecanoate	29,616						1,303		
4,4-Dipropylheptane	15,547							0,957	
Diisooctyl adipate	73,818			11,208					
Mono(2-ethylhexyl) adipate	21,615					7,13			
bis(2-ethylhexyl) hexanedioate	21,257					14,032			

CICLO ALCANOS									
1-Phenylbicyclo (4.1.0) heptane	20,345		2,784						
Methylcyclohexane	2,735			0,615					
Bicyclo [3.1.1] heptane, 6,6-dimethyl-3-methylene	9,164				0,097				
ALDEHIDOS									
Nonanal	12,485								1,918
ALCOHOLES									
4,4'-(Hexafluoroisopropylidene) diphenol	31,437				5,52				
Isopentyl alcohol	3,131						0,151	3,939	
α - Thujenal	10,496				0,318				
Heptanol	3,103							0,415	
2,4,6-Triisopropylphenol	21,898							1,47	
2,4-Di-tert-butylphenol	21,981							1,299	
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS									
Oleic acid	33,112				6,569				
Palmitic acid	30,196				1,354				
Trans-13-Octadecenoic acid	33,085				7,834				
ÉSTERES									
Sulfurous acid, dodecyl 2-pentyl ester	11,078								1,348

Carbonic acid, 2-ethylhexyl undecyl ester	16,31					0,241			
3',8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone	26,583								0,733
Diisooctyl phthalate	26,935		13,905						6,37
Bis (2-ethylhexyl) phthalate	27,105		19,45						
Methyl 12-methyltridecanoate	26,127				0,257				
COMPUESTOS AROMÁTICOS									
(1-Cyclohexen-1-ylmethyl) benzene	20,343				1,373		4,022	3,061	3,387
(1-methylnonyl) benzene	13,86				0,124				
(4-Hydroxyphenyl) phosphonic acid	8,68	34,725							
1,2,4,5-tetramethyl benzene	12,892						0,164		
Isoeugenol									
Eugenol	18,657		3,124						
2-(4-Methoxyphenyl) ethanol	19,019		2,257						
2,5-DI-Tert-butylphenol	21,984		0,706						
Butylated hydroxytoluene	21,897				1,296			2,275	
Methylene DI-T-butylcresol	24,963		4,584			19,268			0,442

6-Tert-butyl-M-cresol	18,649						0,293		
1-Phenanthrenemethanol, 1,2,3,4,4a,9,10,10a- octahydro-1,4a-dimethyl-7- (1-methylethyl)-, 1-acetate, (1R,4aS,10aR)-	68,331			0,66					
1,2,3-trimethoxy-5-prop-2- enylbenzene	22,736					0,219			
MONOTERPENOS									
P-Cymene	12,799						0,184		
SESQUITERPENOS									
Epimanoyl Oxide	64,361			0,363					
Manooyl Oxide	64,315			0,875					
AMINAS									
Isobutyraldehyde Oxime	2,633	1,406							
O-Decylhydroxylamine	15,54				0,226				
Indole	17,3							0,556	

Elaborado por: Los autores, 2019.

4. Conclusiones

Se recolectaron 98 muestras de tejido vegetal de especies del género *Caucaea* de 7 colecciones privadas, para la obtención de ADN y 8 muestras de flores para el análisis químico de los aromas florales.

Mediante el análisis molecular y obtención del árbol filogenético como resultado final se pudo establecer el nivel de familiaridad existente entre las especies en estudio y sus diferencias, las cuales se agruparon en 9 clados evidenciando el nivel de divergencia del gen *matK*.

El estudio de la distribución geográfica y la correlación con la información de filogenia se pudo determinar que los puntos de diversificación de las especies del género *Caucaea* están localizados en la zona sur del Ecuador. Se establece que el área de distribución y corredores biológicos para el grupo *Cucullata* es la zona centro-norte, para el grupo *Nubigena* la zona centro-sur y el grupo *Phalaenopsis* la zona sur del Ecuador.

Especies como *C. sp. nov. chilla*, *C. sp. nov. saraguro*, *C. sp. nov. acaroi* y *C. universitas-cuencae* demuestran niveles de especiación y evolución, por lo tanto, se deben realizar más estudios moleculares en el género *Caucaea* para demostrar su validez como nuevas especies.

En el análisis de los aromas florales mediante cromatografía de gases acoplado a masas, se logró evidenciar que ciertas especies poseen alcanos lineales que podrían favorecer la polinización como atractivos de polinizadores específicos; de igual manera se pudo identificar que existen compuestos propios en cada especie analizada.

5. Recomendaciones

- Recolectar, transportar y manipular las muestras de tejidos vegetales en recipientes térmicos a baja temperatura para evitar alteraciones (oxidación y degradación) del material en estudio.
- Para la obtención de muestras de especies del género *Caucaea* se recomienda visitar los puntos de diversificación obtenidos en el presente estudio.
- Completar el análisis molecular y análisis químico de los aromas florales con las especies restantes descritas del género, para la obtención de resultados más amplios y diferencias significativas a ser discutidas.
- Realizar estudios filogenéticos combinando regiones de ADN cloroplástico y nuclear que permitan resolver las inconsistencias del género *Caucaea* en su clasificación.

6. Bibliografía

- Acosta, J., Salomón, S., Sevilla, I., & Nuevas, L. (2016). Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3).
- Agilent Technologies. (2010). Varian MS workstation.
- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En *Ecología Molecular*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Alonso, Y., Caridad, N., Pérez, M., Collazo, L., Dubiel, A., & Rodríguez, D. (2016). Optimización de los protocolos de extracción de ADN y del marcador molecular tipo RAPD en Anonáceas. *Cultivos Tropicales*, 37, 91-98. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3356.1207>
- Anaya, A. (2003). *Ecología Química*. México D.F.: Plaza y Valdez, S.A.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Barthet, M., & Hilu, K. (2007). Expression of *matK*: Functional and evolutionary implications. *American Journal of Botany*, 94(8), 1402-1412. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.8.1402>
- Baxter, R., Hastings, N., Law, A., & Glass, E. J. . (2008). Las Orquídeas. *Animal Genetics*, 39(5), 561-563.

- Borg-Karlson, A. (1985). Chemical basis for the relationship between *Ophrys* orchids and their pollinators. *Chem*, 25, 283.
- Boucher, F., Zimmermann, N., & Conti, E. (2015). Allopatric speciation with little niche divergence is common among alpine *Primulaceae*. *Journal of biogeography*, 43(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jbi.12652>
- Bustos, T. (2006). *Ecuador patria de orquídeas (Loja y Zamora Chinchipe)*. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Cadavid, I., García, D. ;, & Uribe, S. (2013). Comparison of two DNA extraction methods from plants belonging *Solanum* genus *Leptostemonum* subgenus. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XV, XV(2), 186-192. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015080953>
- Carrión, M. (2009). *Identificación de orquídeas epifitas del Ecuador mediante DNA Barcoding*. Loja.
- Castellanos, C., & Torres, G. (2018). *Orquídeas de Cundinamarca: conservación y aprovechamiento sostenible*. Bogotá D.C.: Zetta comunicadores S.A.
- Cervantes, J. (2013). Extracción de la tintura de *Aloe vera* utilizando el método sólido-líquido, en el equipo de extracción multifuncional mediante diferentes solventes: Etanol, Metanol y Acetona. Recuperado de [https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25409/Extraccion de la tintura de aloe vera utilizando el metodo solido-liquido en el quipo de extraccion multifuncional mediante diferentes solventes etanol%2C metanol y acetona.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25409/Extraccion%20de%20la%20tintura%20de%20aloe%20vera%20utilizando%20el%20metodo%20sólido-líquido%20en%20el%20equipo%20de%20extracción%20multifuncional%20mediante%20diferentes%20solventes%20etanol%2C%20metanol%20y%20acetona.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cetzal, W., Noguera, E., & Basu, S. (2014). Orchidaceae : The Largest Family of

Flowering Plants. En *Encyclopedia of earth*.

Chase, M., & Palmer, J. (1988). Chloroplast DNA variation, geographical distribution and morphological parallelism in subtribe *Oncidiinae* (*Orchidaceae*). *American Journal of Botany*, 75, 163-164.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>

Covelo, L. (2015). *Papel de la metilación del DNA en el control del desarrollo y la estabilidad genómica en dos especies de peces anádromas (Petromyzon marinus y Salmo trutta)*. Universidad de Vigo. Recuperado de [http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/313/Papel de la metilación del ADN.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/313/Papel%20de%20la%20metilaci%C3%B3n%20del%20ADN.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. (Columbia University Press, Ed.). New York.

Cruz, J., Anaya, J., Montero, V., & Ruiz, F. (2017). Extracción de DNA de plántulas de papaya preservadas con silica gel: una alternativa para descartar el uso de nitrógeno líquido. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 21(63), 65-69. Recuperado de http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas63/NotaCientifica-2_T63ExtracciondeDNAdeplantasdepapaya.pdf

Cuéllar, M. (2011). Código de barras genético de algunas orquídeas Veracruzanas bajo riesgo de extinción. *Tesis*, 1, 27.

Cuevas, E. (2012). Mecanismos de especiación ecológica en plantas y animales. *Biológicas*, 14, 7-13. Recuperado de

[https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article
&op=view&path%5B%5D=130&path%5B%5D=129](https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=130&path%5B%5D=129)

Digital World Biology. (2017). FinchTV. Recuperado de <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>

Dodson, C. (2003). *Native Ecuadorian Orchids, Volume 4: Oncidium-Restrepipsis* (1st ed). Dodson Trust.

Dodson, C., & Escobar, R. (2005). *Orquídeas nativas del Ecuador*. Quito: Colina.

Dodson, C. H., Dressler, R. L., Hills, H. G., Adams, R. M., & Williams, N. H. (1969). Biologically Active Compounds in Orchid Fragrances. *Science*, 164(3885), 1243-1249. <https://doi.org/10.1126/science.164.3885.1243>

Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE*.

Fuertes, B., & Mallitasig, D. (2018). *Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género Dracula y Epidendrum (Orchidaceae)*. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5219/1/UPS-QT03794.pdf>

Grajales, J., Meléndez, V., & Cruz, L. (2011). Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000400033

Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de masas y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Nº*, 122, 35.

Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/41780740.pdf>

Hernández, L., Rodríguez, M., García, D., & Pino, J. (2003). Actividad antidermatofítica in vitro de aceites esenciales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 446-451. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000400016&lang=pt

Hijmans, R., Guarino, L., & Mathur, P. (2012). DIVA-GIS.

Hirtz, A. (2004). *El país de las orquídeas tierra incógnita*. Quito.

Instituto Nacional de Biodiversidad. (2008). Protocolo de manejo de colecciones de plantas vasculares proyecto «Desarrollando capacidades compartiendotecnología para la gestión de la biodiversidad en Centroamerica». Recuperado de <https://docplayer.es/4234440-Protocolo-de-manejo-de-colecciones-de-plantas-vasculares.html>

Iza, M. (2018). Identificación molecular de especies de orquídeas del género *Dracula* mediante el sistema Barcode. Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15043>

Kar, P., Goyal, A., & Sen, A. (2015). Maturase K gene in plant DNA barcoding and phylogenetics. En *Plant DNA Barcoding and Phylogenetics* (pp. 79-90). Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/274953807>

Kilvits, H., Alvarez, M., Foust, C., & Aaron, S. (2013). Ecological Epigenetics. *Ecological Genomics. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 781, 191-210. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-7347-9_10

Königer, & Vázquez, D. (2003). *Caucaea universitas-cuencae*. *Arcula*, 14, 357.

Recuperado de http://www.epidendra.org/taxones/Oncidium/Oncidium_universitas-cuencae_2003/oncidium_universitas_cuencae_2003_prot.pdf

Kordrostami, M., & Rahimi, M. (2015). Molecular Markers in Plants: Concepts and Applications. *Genetics in the Third Millenium*, 13(2), 4022-4029. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/282954774_Molecular_markers_in_plants_Concepts_and_applications

León, L. (2006). *Selección y propagación de materiales silvestres promisorios del género Vanilla presentes en guatemala, mediante la caracterización de sus fragancias y el cultivo In Vitro*. Guatemala.

Lindley, J. (1841). *Sertum Orchidaceum*. London: James Ridgway and Sons.

Macherey-Nagel. (2014). Gas Chromatography: Application Guide/Technical Handbook. Recuperado de ftp://www.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/GC/GC_Applis.pdf

Martínez, J. (2002). La evolución y la conservación de la biodiversidad. En *Evolución: la base de la biología* (pp. 407-416).

Martínez, M., De la Cruz, F., Cortes, J., Cadena, D., & Zamarrón, E. (2012). Genes con islas CpG amplificadas con la mezcla formamida, albúmina sérica bovina y dimetilsulfóxido. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana*, 46. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572012000200012

Mazo, L., Gómez, A., Quintanilla, S., Bernal, J., & Ortiz, P. (2014). Consideraciones sobre la historia de la prioridad taxonómica de *Oncidium ornithorhynchum*. *Lankesteriana*, 13(3). <https://doi.org/10.15517/lank.v13i3.14417>

- Ministerio del Ambiente. (2014). MAE regula comercialización de orquídeas. Recuperado de <http://www.ambiente.gob.ec/mae-regula-comercializacion-de-orquideas/>
- Muller, K., Borsch, T., & Hilu, K. (2006). Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: Contrasting *matK*, *trnT-F* and *rbcL* in basal angiosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *41*, 99-117.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. AIYANA Ediciones*. Recuperado de [https://books.google.com.co/books?id=cW5TsDKqx9wC&printsec=frontcover&dq=aceites+esenciales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiT0pGeh83QAhUJMSYKHWWVDP8Q6AEIGzAA#v=onepage&q=aceites esenciales&f=false](https://books.google.com.co/books?id=cW5TsDKqx9wC&printsec=frontcover&dq=aceites+esenciales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiT0pGeh83QAhUJMSYKHWWVDP8Q6AEIGzAA#v=onepage&q=aceites%20esenciales&f=false)
- Parvenn, I., Singh, H., Malik, S., Raghuvanshi, S., & Babbar, S. (2017). Evaluating five different Loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK* and ITS) for DNA Barcoding of Indian Orchids Running Title: DNA Barcoding of Indian Orchids. *Canadian Science Publishing*. Recuperado de <https://mc06.manuscriptcentral.com/genome-pubs>
- Paun, O., Bateman, R., Fay, M., Hedrén, M., Civeyrel, L., & Chase, M. (2010). Stable Epigenetic Effects Impact Adaptation in Allopolyploid Orchids (*Dactylorhiza: Orchidaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, *27*(11), 2465-2473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msq150>
- Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *3*(1), 24-32.
- Pérez, M. (1997). Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. *Simposio científico en Biología Celular y Molecular*, 247-266. Recuperado de

https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9868/CC_30_art_14.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Perfectii, F. (2002). Especiación: modos y mecanismos. En *Evolución: la base de la biología* (pp. 313-314). Recuperado de http://sesbe.org/sites/sesbe.org/files/recursos-sesbe/especiacion_mod_mec.pdf

Phoolcharoen, W., & Sukrong, S. (2012). Molecular analysis of *Vitex* species using candidate DNA barcoding and PCR-RFLP of the *matK* gene for authentication of *Vitex glabrata*. *Natural product communications*, 8(1), 125-128. Recuperado de <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=23472476&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/01841ECF-1819-4C82-959D-D2989D91CB97>

Pinedo, M., Benavides, B., González, R., Sánchez, J., & Ruiz, M. (2018). Corroboración molecular para la identificación morfológica de especies de orquídeas. En *Orquídeas de Cundinamarca. Conservación y aprovechamiento sostenible*. Recuperado de http://www.academia.edu/36515107/Orquídeas_de_Cundinamarca_conservación_y_aprovechamiento_sostenible

Raguso, R. (2015). Wake Up and Smell the Roses : The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 39(October 2008), 549-569. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601>

Rivas, P., & Salazar, P. (2017). *Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el Ishpingo (O. quixos) proveniente de 5 provincias de la amazonía Ecuatoriana*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito. Recuperado de

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14196/1/UPS-QT11665.pdf>

Rivero, A., & Chirino, E. (2015). Evaluación del estado actual de la familia *Orchidaceae* en el Mogote Jesús González localidad Canalete, Valle San Andrés, Cuba. *Revista cubana de ciencias forestales*, 3. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5326973>

Rocha, O., & Duque, J. (2017). Unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre con enfoque orquídeas (*Orchidaceae*). *Agroproductividad*, 10(6), 62-65. <https://doi.org/10.3923/jas.2013.5729.5733>

Saldamando, C. (2010). La posible especiación simpátrica o alosimpátrica de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Boletín del museo entomológico*, 2. Recuperado de <http://ciencias.medellin.unal.edu.co/museos/entomologico/images/Boletin/2010-12/3.pdf>

Sandoval, E., García, J., Terrazas, T., & Villaseñor, J. (2010). Relaciones filogenéticas de la subtribu *Oncidiinae* (*Orchidaceae*) inferidas a partir de caracteres estructurales y secuencias de ADN (ITS y *matK*): un enfoque combinado. *Revista mexicana de biodiversidad*, 81. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532010000200004

Stacy, J. (1975). Studies in the genus *Oncidium* I. *Botanical Museum Leaflets*, 24, 133–191.

Stashenko, E., & Martínez, J. (2014). Gas Chromatography-Mass Spectrometry. <https://doi.org/10.5772/57492>

- Szlachetko, D., & Kolanowska, M. (2015). Five new species of *Caucaea* (*Orchidaceae*) from Colombia and Ecuador. *Polish Botanical Journal*, *60*(2), 127-134. <https://doi.org/10.1515/pbj-2015-0026>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- The Plant List. (2018). *Caucaea*. Recuperado 23 de octubre de 2018, de <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Orchidaceae/Caucaea/>
- Thermo Fisher Scientific. (2018). Thermo Fisher Scientific. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F130WH>
- Trópicos. (2018). *Caucaea*. Recuperado de <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=caucea&commonname=>
- Vere, N., Rich, T. C., Trinder, S., & Long, C. (2015). Plant Genotyping, *1245*(June 2018). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6>
- Vu, T., Le, T., Nguyen, T., Tran, D., & Tran, H. (2017). Review on molecular markers for identification of Orchids. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, *59*(2), 62-75.
- Whitman. (2017). Introduction, Chromatography Theory, and Instrument Calibration. Recuperado 5 de noviembre de 2018, de https://www.whitman.edu/chemistry/edusolns_software/GC_LC_CE_MS_2017/CH_1_2017.pdf
- Wolfgang, J. (2019). Mimicry to effect pollination and dispersal. Recuperado de <https://www.britannica.com/science/mimicry#ref362313>

Xinqi, C., Zhongjian, L., Guanghua, Z., Kaiyong, L., Zhanhe, J., Yibo, L., ... Bell, A.













(2009). *Flora of China. (Orchidaceae)*. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis., 25. Recuperado de http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume25/FOC_25_Orchidaceae_all.pdf













Zuñiga, A. (2017). Evaluación del proceso de curado de la vainilla (*Vanilla* sp.) en condiciones de laboratorio empleando una tecnología artesanal mediante la cuantificación de los principales compuestos aromáticos y el agrado por parte del consumidor. San José.













7. Anexos













Anexo 1. Fotografías de especies del género *Caucaea* (*Orchidaceae*) utilizadas para el estudio filogenético



		
<i>3787 C. nubigena</i>	<i>3788 C. sanguinolenta</i>	<i>3789 C. phalaenopsis</i>
		
<i>3790 C. olivaceae</i>	<i>3791 C. olivaceae</i>	<i>3792 C. tarquiensis</i>
		
<i>3793 C. tarquiensis</i>	<i>3794 C. dayana</i>	<i>3795 C. phalaenopsis</i>
		
<i>3796 C. doblaratum</i>	<i>3797 C. hernandezii</i>	<i>3798 C. hernandezii</i>

		
<i>3799 C. cucullata</i>	<i>3800 C. tripterygia</i>	<i>3801 C. tarquiensis</i>
		
<i>3802 C. sp. nov. acaroi</i>	<i>3803 C. chimborazoense</i>	<i>3804 C. macrochilum</i>
		
<i>3805 C. macrochilum</i>	<i>3806 C. macrochilum</i>	<i>3807 C. macrochilum</i>
		
<i>3808 C. macrochilum</i>	<i>3810 C. chimborazoense</i>	<i>3811 C. nubigena rosada</i>

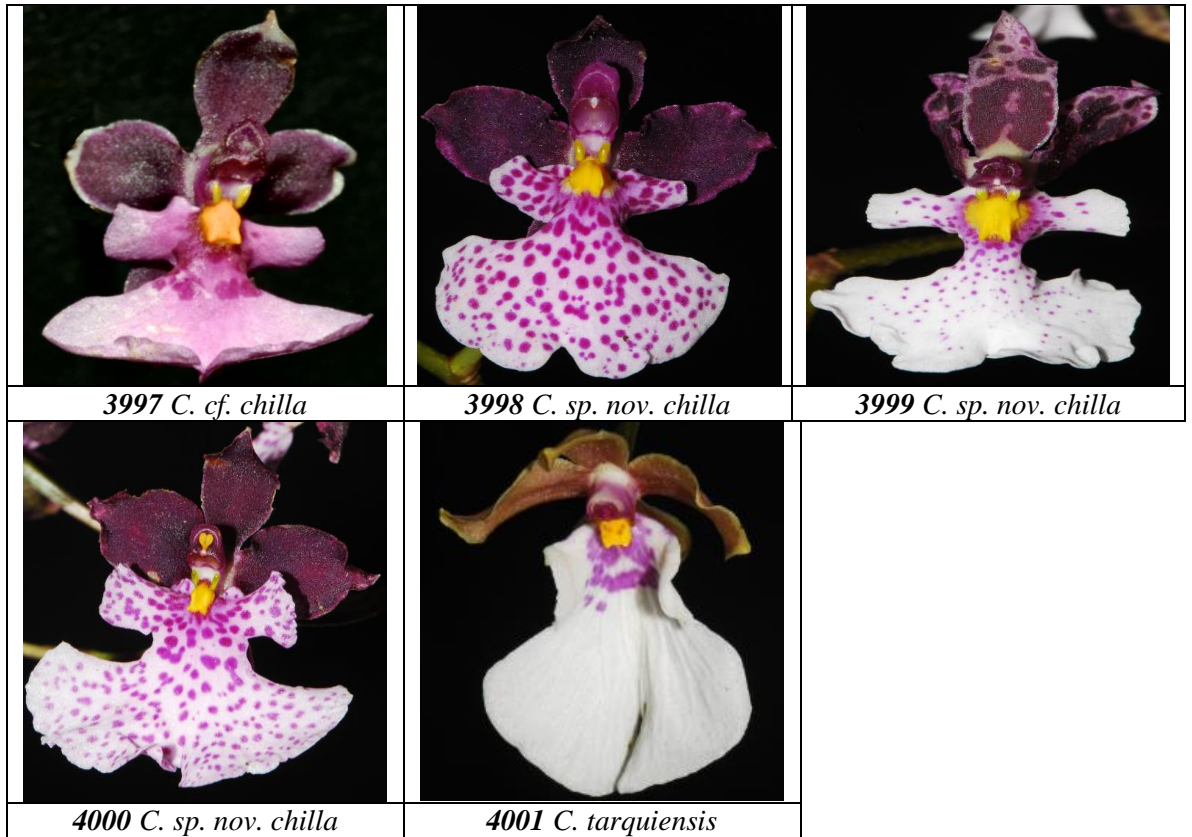
		
3812 <i>C. nubigena</i>	3813 <i>C. cucullata</i>	3814 <i>C. tarquiensis</i>
		
3815 <i>C. phalaenopsis</i>	3816 <i>C. phalaenopsis</i>	3817 <i>C. hernandezii</i>
		
3818 <i>C. nubigena</i>	3819 <i>C. phalaenopsis</i>	3820 <i>C. tarquiensis</i>
		
3821 <i>C. nubigena</i>	3822 <i>C. phalaenopsis</i>	3823 <i>C. cf. cucullata</i>

		
3824 <i>C. nubigena</i>	3825 <i>C. tarquiensis</i>	3826 <i>C. sp. nov. saraguro</i>
		
3827 <i>C. nubigena</i> (Cañar)	3828 <i>C. nubigena</i> (Santa Isabel)	3829 <i>C. universitas-cuencae</i>
		
3830 <i>C. nubigena azuayensis</i>	3831 <i>C. tarquiensis</i>	3832 <i>C. dayana</i>
		
3833 <i>C. phalaenopsis</i>	3834 <i>C. nubigena</i>	3835 <i>C. nubigena alba</i>

		
3836 <i>C. aff. sanguinolenta</i>	3837 <i>C. nubigena alba</i>	3838 <i>C. cucullata</i>
		
3839 <i>C. nubigena rosada</i>	3840 <i>C. nubigena</i>	3841 <i>C. cf. azuayensis</i>
		
3842 <i>C. cf. azuayensis</i>	3843 <i>C. cf. azuayensis</i>	3844 <i>C. cf. azuayensis</i>
		
3845 <i>C. cf. azuayensis</i>	3846 <i>C. rosada</i>	3847 <i>C. phalaenopsis</i>



		
<i>3860 C. radiata</i>	<i>3861 C. sanguinolenta</i>	<i>3862 C. mimetica</i>
		
<i>3863 C. nubigena (Jimbura)</i>	<i>3864 C. cf. nubigena</i>	<i>3865 C. tarquiensis</i>
		
<i>3866 C. nubigena</i>	<i>3867 C. nubigena</i>	<i>3868 C. cucullata</i>
		
<i>3994 C. pichincha</i>	<i>3995 C. pichincha</i>	<i>3996 C. andreetana</i>



Nota: Código de fotografía: 3778 - 3784 Marco Cerna; 3785 - 3791 Luis Baquero; 3792 - 3997 Alex Hirtz; 3998 - 4001 Francisco Tobar.

Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 2. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Número de muestras	Código de colección	Nombre científico	Extracción de ADN	Amplificación	Secuenciación
1	3778	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
2	3779	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
3	3780	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	-
4	3781	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
5	3782	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
6	3783	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
7	3784	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
8	3785	<i>Caucaea sanguinolenta</i>	+	+	+
9	3786	<i>Caucaea olivácea</i>	+	+	+
10	3787	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
11	3788	<i>Caucaea sanguinolenta</i>	+	+	+
12	3789	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
13	3790	<i>Caucaea olivacea</i>	+	+	+
14	3791	<i>Caucaea olivacea</i>	+	+	+
15	3792	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+
16	3793	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+
17	3794	<i>Caucaea dayana</i>	+	+	+
18	3795	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
19	3796	<i>Caucaea doblaratum</i>	+	+	+
20	3797	<i>Caucaea hernandezii</i>	+	+	+
21	3798	<i>Caucaea hernandezii</i>	+	+	+
22	3799	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
23	3800	<i>Caucaea tripterygia</i>	+	+	+
24	3801	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+
25	3802	<i>Caucaea sp. nov. acaroi</i>	+	+	+
26	3803	<i>C. chimborazoensis</i>	+	+	+
27	3804	<i>Caucaea macrochilum</i>	+	+	+
28	3805	<i>Caucaea macrochilum</i>	+	+	+
29	3806	<i>Caucaea macrochilum</i>	+	+	+
30	3807	<i>Caucaea macrochilum</i>	+	+	+
31	3808	<i>Caucaea macrochilum</i>	+	+	+
32	3810	<i>C. chimborazoensis</i>	+	+	-
33	3811	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	+	+	+
34	3812	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
35	3813	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	-
36	3814	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+

37	3815	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
38	3816	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
39	3817	<i>Caucaea hernandezii</i>	+	+	+
40	3818	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
41	3819	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
42	3820	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+
43	3821	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
44	3822	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	-
45	3823	<i>Caucaea cf. cucullata</i>	+	+	+
46	3824	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
47	3825	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+
48	3826	<i>Caucaea sp. nov. saraguro</i>	+	+	+
49	3827	<i>C. nubigena (Cañar)</i>	+	+	+
50	3828	<i>C. nubigena (Santa Isabel)</i>	+	+	+
51	3829	<i>C. universitas cuencaae</i>	+	+	+
52	3830	<i>Caucaea azuayensis</i>	+	+	-
53	3831	<i>Caucaea azuayensis</i>	+	+	+
54	3832	<i>Caucaea dayana</i>	+	+	+
55	3833	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
56	3834	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
57	3835	<i>Caucaea nubigena alba</i>	+	+	+
58	3836	<i>C. aff. sanguinolenta</i>	+	+	+
59	3837	<i>Caucaea nubigena alba</i>	+	+	+
60	3838	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
61	3839	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	+	+	+
62	3840	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
63	3841	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
64	3842	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
65	3843	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
66	3844	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
67	3845	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
68	3846	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	+	+	+
69	3847	<i>Caucaea phalaenopsis</i>	+	+	+
70	3848	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+

71	3849	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
72	3850	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
73	3851	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
74	3852	<i>Caucaea nubigena</i>	+	+	+
75	3853	<i>Caucaea rhodosticta</i>	+	+	+
76	3854	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
77	3855	<i>Caucaea cf. phalaenopsis</i>	+	+	+
78	3856	<i>Caucaea cf. cucullata</i>	+	+	+
79	3857	<i>Caucaea cf. azuayensis</i>	+	+	+
80	3858	<i>Caucaea cf. phalaenopsis</i>	+	+	+
81	3859	<i>Caucaea cf. phalaenopsis</i>	+	+	+
82	3860	<i>Caucaea radiata</i>	+	+	+
83	3861	<i>Caucaea sanguinolenta</i>	+	+	+
84	3862	<i>Caucaea mimetica</i>	+	+	+
85	3863	<i>Caucaea nubigena (Jimbura)</i>	+	+	+
86	3864	<i>Caucaea cf. nubigena</i>	+	+	+
87	3865	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+
88	3866	<i>Caucaea nubigena rosada</i>	+	+	+
89	3867	<i>Caucaea nubigena sp.</i>	+	+	+
90	3868	<i>Caucaea cucullata</i>	+	+	+
91	3994	<i>Caucaea pichincae</i>	+	+	+
92	3995	<i>Caucaea pichincae</i>	+	+	+
93	3996	<i>Caucaea andreetana</i>	+	+	-
94	3997	<i>Caucaea cf. chillia</i>	+	+	+
95	3998	<i>Caucaea sp. nov. chillia</i>	+	+	+
96	3999	<i>Caucaea sp. nov. chillia</i>	+	+	+
97	4000	<i>Caucaea sp. nov. chillia</i>	+	+	+
98	4001	<i>Caucaea tarquiensis</i>	+	+	+

Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 3. Distribución geográfica de especies del género *Caucaea* utilizadas en esta investigación

Especie	Ubicación	Altura (msnm)	Latitud	Longitud
<i>C. sp. nov. acaroi</i>	La mañosca	2800	-0.1925	-78.4903
<i>C. andreetana</i>	La mañosca	2800	-0.1925	-78.4903
<i>C. azuayensis</i>	Azuay	2800	-2.8972	-79
<i>C. chimborazoense</i>	Guaranda	3200	-1.453	-79.018
	Chunchi	3200	-2.2936	-78.9252
<i>C. cucullata</i>	JBQ	2800	-0.2033	-78.4913
	El Quinche	2600	-0.1402	-78.2988
	Azuay	2800	-2.8972	-79
	Imbabura	300	0.1391	78.2713
<i>C. sp. nov. chilla</i>	El Oro	2600	-3.4644	-79.5922
<i>C. dayana</i>	La mañosca	2800	-0.1925	-78.4908
	Loja	2900	-4.6311	-79.4525
<i>C. doblaratum</i>	Carchi	3000	-0.5191	-77.9086
	La mañosca	2800	-0.1925	-78.4908
<i>C. hernandezii</i>	Baeza	2400	-0.4772	-77.8991
	La Mañosca	2800	-0.1925	-78.4908
<i>C. nubigena</i>	Jimbura	3000	-4.6311	-79.4525
<i>C. macrochilum</i>	Aloasi – El Corazón	3100	-0.5377	-78.6666
<i>C. nubigena</i>	JBQ	2800	-0.2033	-78.4913
	Azuay	2800	-2.8972	-79
<i>C. nubigena</i>	Cañar	2600	-2.3677	-78.803
<i>C. nubigena</i>	Santa Isabel	2900	-3.293	-79.3211
<i>C. nubigena alba</i>	Azuay	2800	-2.8972	-79
<i>C. nubigena rosada</i>	Cuenca	3000	-2.9127	-79.0063
<i>C. phalaenopsis</i>	JBQ	2800	-0.1925	-78.4908

	La Mañosca	2800	-0.2033	-78.4913
	Loja	2800	-4.6311	-79.4525
<i>C. pichincae</i>	Cochasqui	2800	0.0898	-78.3188
<i>C. radiata</i>	Loja	2800	-4.6311	-79.4525
<i>C. rhodosticta</i>	Saraguro	2900	-3.6247	-79.2344
<i>C. sanguinolenta</i>	JBQ	2800	-0.1925	-78.4908
	Azuay	2800	-2.8972	-79
<i>C. tarquiensis</i>	Tarqui	2900	-2.8961	-79.018
	El tambo	3300	-2.5083	-78.9175
<i>C. tripterygia</i>	Loja	2800	-4.6311	-79.4525
<i>C. universitas cuencaae</i>	Cuenca	3000	-2.5083	-78.9175

Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 4. Tiempos de retención y porcentaje de cada compuesto de las especies analizadas

Caucaea cucullata 3799

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Bicyclo [3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-3-methylene	9,164	0,097
α - Thujenal	10,496	0,318
Hentriacontane	11,081	0,63
2,6-Dimethyldecane	12,353	0,219
(1-methylnonyl) benzene	13,86	0,124
2,6,11-trimethyldodecane	15,33	0,358
O-Decylhydroxylamine	15,54	0,226
2,6,10-trimethyl tetradecane	16,151	0,155
7-methyl hexadecane	16,301	0,254
Octacosane	16,523	0,526
Heptacosane	16,529	0,946
Heneicosane	16,831	2,195
Hexacosane	16,825	1,283
7,9-dimethyl hexadecane	17,17	0,211
Nonadecane	17,343	0,346
(1-Cyclohexen-1-ylmethyl) benzene	20,343	1,373
Hexadecane	20,765	0,273
Pentadecano	20,888	0,289
2-Methyloctadecane	21,174	0,27
Butylated Hydroxytoluene	21,897	1,296
Heptadecane	22,484	1,026
Methyl 12-methyltridecanoate	26,127	0,257
5,5,7,7-Tetraethylundecane	29,358	1,121
Ácido palmítico	30,196	1,354
4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	31,437	5,52
Glyceryl Monooleate	32,101	1,381
Trans-13-Octadecenoic acid	33,085	7,834
Ácido oleico	33,112	6,569

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. nubigena rosada 3811

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Dodecano	11,085	0,182
5-Ethyldecane	15,03	0,078
Nonacosano	15,333	0,094
Heptadecane	17,926	0,222
Carbonic acid, 2-ethylhexyl undecyl ester	16,31	0,241
Pentadecane	16,832	0,797
2,6,10-trimethyl tetradecane	17,038	0,096
7,9-Dimethyl hexadecane	17,347	0,09
bis(2-ethylhexyl) hexanedioate	21,257	14,032
Mono(2-ethylhexyl) adipate	21,615	7,13
5-Methyltetradecane	22,481	0,139

1,2,3-trimethoxy-5-prop-2-enylbenzene	22,736	0,219
Methylene DI-T-butylcresol	24,963	19,268

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. nubigena 3787

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
2,6,11-Trimethyldodecane	11,081	0,762
Dodecane	11,082	0,613
4,5-Dimethylnonane	11,241	0,295
Pentadecane	15,028	0,376
5-Methyltetradecane	15,029	0,37
2,6-Dimethylundecane	15,331	0,43
2,6-Dimethylheptadecane	15,332	0,535
3-Methylundecane	15,548	0,538
Octacosano	16,011	0,449
2,6,10-Trimethyltridecane	16,011	0,519
7-Methyl hexadecane	16,307	0,724
2,6,10-trimethyl tetradecane	16,53	1,506
5-Methyltetradecane	16,531	1,43
Heneicosane	16,832	3,705
Heptadecane	17,036	0,529
Eugenol	18,657	3,124
2-(4-Methoxyphenyl) ethanol	19,019	2,257
1-Phenylbicyclo (4.1.0) heptane	20,345	2,784
Hexadecane	20,983	0,542
2,5-DI-Tert-butylphenol	21,984	0,706
Methylene DI-T-butylcresol	24,962	4,584
Bis (2-ethylhexyl) phthalate	26,933	15,554
Diisooctyl phthalate	27,105	19,45
Nonacosane	32,733	18,661
Tetracontane	32,825	20,271
Dotetracontane	33,027	1,957
Hentriacontane	33,072	4,328
Dotriacontane	33,559	0,251

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. cucullata (3813)

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Isopentyl alcohol	3,131	0,151
2,2-Dimethyloctadecane	9,868	0,172
2,6,7-Trimethyldecane	10,137	0,398
Eicosane	11,084	1,733
4,5-Dimethylnonane	11,244	0,68
2,6,10-Trimethylpentadecane	12,357	0,748
P-Cymene	12,799	0,184
1,2,4,5-tetramethylbenzene	12,892	0,164
2,6,6-Trimethyldecane	14,088	0,401
Octacosane	14,35	0,505
Tetradecane	15,031	0,792
4-Ethyldecane	15,247	0,444
2,6-Dimethylundecane	15,333	1,059
5-Ethyldecane	15,55	1,018

Heptacosane	16,013	0,896
5-Methyltetradecane	16,155	0,43
Heptadecane	16,231	0,235
Pentadecane	16,31	1,45
2,6,10-trimethyl tetradecane	16,397	0,069
Nonadecane	17,927	1,823
6-Tert-butyl-M-cresol	18,649	0,293
2,5-Dimethyltetradecane	18,902	0,545
3,5,24-Trimethyltetracontane	19,089	0,434
Hexadecane	19,617	0,236
4-Methyltetradecane	20,153	0,871
(1-Cyclohexen-1-ylmethyl) benzene	20,346	4,022
Dotriacontane	20,889	1,008
Hexacosane	21,04	1,428
Tricosane	21,47	1,569
Docosane	21,555	5,921
2,6,10-Trimethyltridecane	21,814	0,416
Tetracosane	23,955	0,277
Octadecane	25,678	2,48
Methyl tetradecanoate	26,13	0,373
Methyl hexadecanoate	29,616	1,303
Tetracontane	32,813	6,322
Hentriacontane	33,036	1,25

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. mimetica 3762

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Sulfurous acid, dodecyl 2-pentyl ester	11,078	1,348
4,5-Dimethylnonane	11,081	0,657
2,6-Dimethylheptadecane	11,24	0,288
Nonanal	12,485	1,918
5-Ethyldecane	15,328	0,884
2,6-Dimethylundecane	15,329	0,568
2,6,10-trimethyl tetradecane	16,306	0,955
Heptadecane	16,528	2,031
5-Methyltetradecane	16,529	1,677
4,6-Dimethyldodecane	16,829	5,104
Pentadecane	16,831	3,638
(1-Cyclohexen-1-ylmethyl) Benzene	20,344	3,387
Nonadecane	21,549	4,068
Hexadecane	21,552	5,3
Tritriacontane	22,48	1,406
Methylene DI-T-butylcresol	24,781	0,442
Hexacosane	25,675	2,531
3',8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone	26,583	0,733
Diisooctyl phthalate	26,935	13,905
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	26,991	6,37
Pentatriacontane	32,718	20,493
Heptacosane	32,806	11,976
Dotriacontane	32,918	3,237

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. cucullata (3778)

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Isobutyraldehyde Oxime	2,633	1,406
(4-Hydroxyphenyl) phosphonic acid	8,68	34,725

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. tarquiensis (3792)

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Heptane	2,441	81,462
Methylcyclohexane	2,735	0,615
Manoyl Oxide	64,315	0,875
Epimanoyl Oxide	64,361	0,363
1-Phenanthrenemethanol, 1,2,3,4, 4a, 9,10, 10a-octahydro-1, 4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, 1-acetate, (1R,4aS,10aR)-	68,331	0,66
Diisooctyl adipate	73,818	11,208

Elaborado por: Los autores, 2019.

C. cucullata (3823)

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje (%)
Heptanol	3,103	0,415
Isopentyl alcohol	3,122	3,939
4,5-Dimethylnonane	11,079	1,111
2,4,6-Trimethyldecane	11,078	1,929
Octacosane	15,027	0,731
4,4-Dipropylheptane	15,547	0,957
2,6,7-Trimethyldecane	16,308	0,763
Pentadecano	16,528	2,975
7,9-Dimethylhexadecane	16,83	6,4
Indole	17,3	0,556
Heptadecane	17,035	0,948
Hexacosane	17,924	1,179
(1-Cyclohexen-1-ylmethyl) Benzene	20,343	3,061
Pentacosane	21,465	1,238
2,6,10-Trimethyltetradecane	21,467	0,856
Eicosane	21,552	6,067
Butylated Hydroxytoluene	21,896	2,275
2,4,6-Triisopropylphenol	21,898	1,47
2,4-Di-tert-butylphenol	21,981	1,299
Hexacosane	25,677	2,769
7,7-Diethylheptadecane	30,506	2,924
Dotetracontane	30,76	10,677
Heptacosane	32,705	11,494
Tetracosane	32,708	10,574
Tricosane	32,858	3,422

Elaborado por: Los autores, 2019.